UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

"Análisis filogenético, patogénico y diversidad genética de especies de *Fusarium* asociadas a malformación de caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla*)"

TESIS

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA
M. C. Ricardo Santillán Mendoza

Asesor: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

Comité Tutural

Dra. Sylvia P. Fernández Pavía (Co-asesora). IIAF-UMSNH.

Dra. Julieta Benítez Malvido. IIES-UNAM.

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo. CMEB-UMSNH.

Dr. Juan Carlos Montero Castro. Facultad de Biología-UMSNH.

Morelia, Michoacán. Agosto de 2018.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado y la coasesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) becario No. 258550 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado y la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, por el apoyo y la confianza que depositaron en mí, por los consejos y el conocimiento que me han proporcionado, así como la paciencia que me brindaron durante todos estos años en su laboratorio.

A mi comité tutoral:
Dra. Julieta Benítez Malvido
Dr. Juan Carlos Montero Castro
Dr. Gerardo Vázquez Marrufo

Por las correcciones, los valiosos consejos, el tiempo que dedicaron y los comentarios que aportaron durante la realización del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, por hacer más agradable la estancia en el laboratorio, así como por sus comentarios y ayuda.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, por ofrecer el espacio para el desarrollo del proyecto, el financiamiento y la formación de capital humano de alto nivel para el mejoramiento de la sociedad Michoacana.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de doctorado (Becario 258550).

A mi familia por siempre apoyarme para realizar mis sueños, por creer en mí y darme animos en momentos difíciles, Ricardo y Victoria, los amores de mi vida.

CONTENIDO

Resumen general. 9

Abstract. 12

Introducción general. 15

Especies de *Fusarium* causantes de enfermedades en cultivos agrícolas. 15

Fusarium agente causal de la malformación del mango. 15

Caracterización de las especies de *Fusarium* causantes de MMD. 17

Malformación causada por *Fusarium* en otras especies vegetales en México. 18

Diversidad genética en fusaria causantes de malformación. 18

Justificación. 20

Hipótesis. 20

Objetivo general. 20

Objetivos específicos. 20

Capítulo I. Una nueva enfermedad de caoba de hoja grande causada por dos especies de *Fusarium* en México. 21

Resumen. 22

Antecedentes. 23

Materiales y Métodos. 26

Sitios de colecta y estrategia de muestreo. 26

Aislamientos de tejidos malformados de árboles de caoba de hoja grande. 27

Extracción de ADN genómico. 28

Análisis de Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR). 28

Análisis de PCR para tipos de apareamiento. 29

Identificación filogenética molecular multilocus de los aislados de hongos. 29

Experimentos de patogenicidad. 30

Resultados. 31

Sintomatología de la malformación vegetativa de caoba de hoja grande. 31

Genotipificación de aislados de *Fusarium* asociados con la enfermedad malformación de caoba de hoja grande. 32

Filogenia Molecular. 32

Idiomorfos de tipos de compatibilidad. 33

Pruebas de patogenicidad en plántulas de caoba de hoja grande. 33

Discusión. 34

Agradecimientos. 37

Literatura citada. 37

Cuadro 1. Pruebas de patogenicidad en plántulas de caoba de hoja grande usando cepas de *Fusarium* asociadas con la enfermedad malformación en Michoacán, México. 46

Figuras. 47

Figura 1. Mapa de Michoacán, México, mostrando las áreas donde se colectaron muestras de árboles de caoba de hoja grande con síntomas de malformación. 47

Figura 2. Síntomas de malformación en árboles de caoba de hoja grande. 48

Figura 3. Árbol Filogenético de Máxima Parsimonia. 49

Figura 4. Pruebas de Patogenicidad. 50

Fig. Suplementaria S1. Patrones ISSR de aislados de *Fusarium* recuperados de árboles de caoba de hoja grande con la enfermedad malformación. 51

Capítulo II. Diversidad genética de *Fusarium mexicanum,* agente causal de la malformación de mango y caoba de hoja grande en México. 52

Resumen. 52

Introducción. 54

Materiales y Métodos. 58

Colecta de tejido de mango y caoba con malformación. 58

Obtención de aislados de *Fusarium* a partir de tejido con malformación. 58

Extracción de ADN. 59

Identificación molecular de los aislados fúngicos. 59

Análisis ISSR (Secuencias Internas Repetidas Simples). 60

Análisis de polimorfismos. 61

Ensayo de PCR para la determinación del tipo de compatibilidad sexual. 62

Resultados. 62

Identificación molecular y análisis filogenético. 62
Selección de oligonucleótidos ISSR. 63
Análisis y distribución espacial de la variación genética. 63
Agrupamientos ISSR. 64
Determinación del tipo de compatibilidad sexual (*MAT*). 64
Discusión. 65
Agradecimientos. 68
Literatura citada. 68

Cuadros. 76

Cuadro 1. Caracterización de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de tejido malformado de mango y caoba de hoja grande en Michoacán, México. 76

Cuadro 2. Selección de oligonucleótidos ISSR utilizados para los análisis de diversidad genética de *F. mexicanum.* 78

Cuadro 3. Análisis de diversidad genética entre poblaciones de *F. mexicanum* aislados de malformación de mango y caoba de hoja grande en Michoacán. 79

Cuadro 4. Matriz de población por pares de la distancia genética para los aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba. 80

Figuras. 81

Figura 1. Mapa de Michoacán, México, mostrando las áreas donde se colectaron muestras de árboles de mango y caoba de hoja grande con síntomas de malformación. 81

Figura 2. Árbol de Máxima Verosimilitud inferido con el gen *TEF1*. 82

Figura 3. Patrones ISSR obtenidos con el oligonucleótido 891 para las cepas de *F. mexicanum* aisladas de árboles de mango y de caoba de hoja grande con malformación. 83

Figura 4. Dendograma Neighbor-Joining basado en el coeficiente de similitud de Nei para los 61 aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba de hoja grande. 84

Conclusiones generales. 85

Literatura complementaria. 86

Anexo I. Protocolos I. Microbiología. 93

Preparación de medios de cultivo. 93

Medio líquido papa dextrosa. 93

Cuadro 1. Ingredientes para preparar medio líquido papa dextrosa. 94

Medio agar papa dextrosa deshidratado (PDA) con PCNB y antibióticos. 94

Cuadro 2. Ingredientes para preparar medio agar papa dextrosa. 95

Medio agar peptona PCNB (PPA o medio Nash-Snyder) y antibióticos. 95

Cuadro 3. Ingredientes para preparar medio agar peptona PCNB. 97

Medio SNA (medio sintético bajo en nutrientes, Nirenberg y O´Donnell 1998). 97
Cuadro 4. Ingredientes para preparar medio SNA. 98
Medio agar agua 2%. 99
Medio agar hojas de clavel 2% (CLA). 99
Colecta, aislamiento, purificación y patogenicidad de *Fusarium*. 100
Colecta de tejido vegetal de caoba con síntomas de malformación. 100
Aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido vegetal (directo). 100
Aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido vegetal (diluciones). 101
Purificación de aislados de *Fusarium* por punta de hifa. 102
Caracterización cultural de *Fusarium*. 103
Caracterización morfológica de *Fusarium.* 103
Preparación del inóculo para pruebas de patogenicidad. 104
Germinación e inoculación de plántulas de caoba de hoja grande. 104
Reaislamiento de aislados de *Fusarium* inoculados en las pruebas de patogenicidad. 105
Anexo II. Protocolos II. Biología Molecular. 106
Extracción de ADN genómico de *Fusarium*. 106
Cuadro 1. Buffer de Lisis pH 8.0 para la extracción de ADN. 108
Modo de preparación del Buffer de Lisis para la extracción de ADN. 108
Cuantificación de la concentración de ADN genómico utilizando un aparato Varioskan Flash (Thermo Scientific). 108
Reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares. 109
Cuadro 2. Reactivos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares. 110
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones parciales de genes nucleares. 111
Figura 1. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares. 111
Reacciones de PCR para amplificar Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR). 111

Cuadro 4. Reactivos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar secuencias internas repetidas simples (ISSR). 112
Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar inter secuencias repetidas simples (ISSR). 112
Figura 2. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar secuencias internas repetidas simples (ISSR). 112
Instrucciones para usar del termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). 113
Electroforesis en gel de agarosa. 114
Cuadro 6. Reactivos usados para preparar Buffer TAE 50X (Tris Acetato-EDTA) pH 8.5. 116
Cuadro 7. Características de las cámaras de electroforesis y de los geles de agarosa que se utilizaron para analizar productos de PCR. 117
Cuadro 8. Preparación del buffer de carga 6X (GLB, Gel Loading Buffer 6X). 117
Purificación de los productos de ADN amplificados por PCR. 117
Figura 3. Pasos para la purificación de los productos de ADN amplificados por PCR. 119

Resumen general

Las especies del género *Fusarium* poseen una gran diversidad genética, distribuyéndose mundialmente en plantas, suelos y otros hábitats, se caracterizan por causar enfermedades en prácticamente todos los cultivos de importancia agronómica, ocasionando pérdidas de miles de millones de dólares anualmente. En México, las especies *Fusarium mexicanum* y *F. pseudocircinatum* son los agentes causales de la enfermedad malformación del mango (MMD), la principal enfermedad del cultivo. A la fecha, *F. mexicanum* únicamente ha sido reportada en México, y es la especie que prevalece en huertas y viveros comerciales de mango de la región centro occidente. En un estudio llevado a cabo en zonas productoras de mango en los estados de Colima y Michoacán, se detectaron árboles de caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) con síntomas de malformación. Malformaciones presentes en estos árboles reducen drásticamente el valor estético y comercial de la madera. Los árboles de caoba son considerados un recurso forestal importante por el valor comercial de su madera. Recientemente el gobierno mexicano ha provisto incentivos económicos para aumentar la producción de especies maderables de gran valor en el país, incluyendo la caoba. *S. macrophylla* es de origen neotropical y se distribuye de manera natural desde el centro de México, a través de América Central, y hasta la parte sur de la cuenca del Amazonas en Bolivia y Brasil. Sin embargo, la sobreexplotación de la madera, ha reducido drásticamente las poblaciones en los últimos 60 años y la preocupación por su conservación ha resultado en la inclusión de la caoba en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres

(CITES) en 2003. A pesar del interés en aumentar la producción, poco es conocido sobre los factores que impactan a este importante árbol. Varios hongos han sido aislados de árboles de una especie relacionada, *S. mahagoni* (caoba de las Indias Occidentales), algunos de los cuales se encontraron asociados con “agallas” o “escoba de bruja”; sin embargo, es desconocida la identidad de esos hongos. Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar las especies de *Fusarium* que estaban asociadas con la enfermedad malformación de la caoba de hoja grande, determinar las relaciones filogenéticas, determinar su patogenicidad y analizar la diversidad genética de los aislados. Los síntomas de malformación observados en caoba para los cuatro sitios muestreados en Michoacán, son similares a los observados en la fase vegetativa de la malformación de mango, incluido el crecimiento compacto y agrupado de los brotes apicales y laterales con internodos muy acortados y hojas pequeñas que se curvan hacia el tallo de soporte. Mediante análisis moleculares multilocus, de un total de 163 aislados que fueron recuperados de tejidos sintomáticos, la mayoría fueron identificados como *Fusarium pseudocircinatum* (N = 121) y *F. mexicanum* (N = 39); dos aislados representaron filoespecies sin nombre dentro del complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti* (FIESC 20-d y FIESC 37-a) y otro aislado se ubicó en el complejo de especies de *F. solani* (FSSC 25-m). Sin embargo, solamente *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* causaron síntomas de malformación en plántulas de caoba de 14 días. Además, debido a que *F. mexicanum* es el principal agente causal de MMD, la diversidad genética de aislados obtenidos de malformación de mango y de caoba fue determinada mediante un análisis de secuencias internas repetidas simples

(ISSR). Un total de 61 aislados de *F. mexicanum* fueron analizados, 32 de malformación de mango y 29 de malformación de caoba. Inicialmente 14 oligonucleótidos ISSR fueron probados, seleccionándose cinco que generaron un mayor número de bandas polimórficas. Las huellas genéticas obtenidas indicaron que existe mayor diversidad genética entre los aislados provenientes de malformación de mango con respecto a los obtenidos de malformación de caoba. Cabe señlar que una localidad mostró una diversidad alta dentro de los aislados de mango. Por lo tanto, la diversidad genética es más sensible al hospedante que a la región geográfica. Por último, el análisis del tipo de compatibilidad sexual (*MAT*) indicó que en los aislados de malformación de mango ambos idiomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2* estuvieron presentes, mientras que en caoba sólo se presentó *MAT1-2*. En conjunto, los resultados indican que *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*, previamente reportados en México como agentes causales de la malformación de mango (MMD), también afectan a la caoba de hoja grande. Este es el primer reporte de esta nueva enfermedad y es la primera vez que se ha demostrado que *F. mexicanum* afecta un hospedante diferente al mango. Además, es la primera vez que se estudia la diversidad genética de *F. mexicanum* y los resultados resaltan la necesidad de determinar si este patógeno se está reproduciendo sexualmente en mango, lo cual es importante para el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: β-tubulina, *RPB1*, *TEF1*, rADN, filogenia, ISSRs, Mating Types, enfermedades de árboles tropicales, *S. macrophylla, M. indica*, escoba de brujas.

Abstract

The species of the genus *Fusarium* possess a great genetic diversity, are distributed worldwide in plants, soils and other habitats, and are characterized by causing diseases in practically all crops of agronomic importance, causing losses of billions of dollars annually. In Mexico, the species *Fusarium mexicanum* and *F. pseudocircinatum* are the causal agents of the mango malformation disease (MMD), the main disease of the crop. To date, *F. mexicanum* has been reported in Mexico only, and is the species that prevails in commercial mango orchards and nurseries in the central western region. In a study carried out in mango producing areas in the states of Colima and Michoacán, big-leaf mahogany trees (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) with symptoms of malformation were detected. Malformations present in those trees drastically reduce their aesthetic and commercial value. Mahogany trees are considered an important forest resource worldwide. Recently, the Mexican government has provided economic incentives to increase the production of valuable timber species in the country, including mahogany. *S. macrophylla* is of neotropical origin and is distributed naturally from central Mexico, through Central America, and to the southern part of the Amazon basin in Bolivia and Brazil. However, overexploitation of its wood has drastically reduced populations in the last 60 years and concern for its conservation has resulted in the inclusion of mahogany in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) in 2003. Despite the interest in increasing its production, little is known about the factors that impact this important tree. Several fungi have been isolated from trees of a related species, *S. mahagoni* (mahogany from the West

Indies), some of which were found associated with "galls" or "witches' brooms"; however, the identity of these fungi is unknown. The objectives of this research were to characterize the *Fusarium* species associated with mahogany malformation disease, to determine phylogenetic relationships, to prove their pathogenicity and to analyze their genetic diversity. Symptoms on big-leaf mahogany at four sites sampled in Michoacán, resembled those of the vegetative phase of mango malformation, including compact, bunched growth of apical and lateral buds with greatly shortened internodes and small leaves that curved back towards the supporting stem. Using molecular multilocus data, of a total of 163 isolates that were recovered from symptomatic tissues, the majority were identified as *Fusarium pseudocircinatum* (N = 121) and *F. mexicanum* (N = 39); two isolates represented unnamed phylospecies within the species complex of *F. incarnatum-equiseti* (FIESC 20-d and FIESC 37-a) and another isolate was located in the species complex of *F. solani* (FSSC 25-m). However, only *F. mexicanum* and *F. pseudocircinatum* induced malformation symptoms on 14-day-old seedlings of big-leaf mahogany. In addition, because *F. mexicanum* is the main causal agent of MMD, the genetic diversity of isolates obtained from mango and mahogany malformations was analyzed using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). A total of 61 isolates of *F. mexicanum* were used, 32 of mango malformation and 29 of mahogany malformation. Initially, 14 ISSR oligonucleotides were tested, selecting five oligonucleotides that generated the greatest number of polymorphic bands. The genetic fingerprints indicated that there is greater genetic diversity among isolates originated from mango malformation in contrast to those obtained from mahogany malformation. It is important to mention

that only mango isolates from one locality showed high diversity. Therefore, it seems that genetic diversity is mainly influenced by the host, with influence by the geographical region playing a secondary role in diversity. Finally, the analysis of Mating Types (*MAT*) indicated that the isolates from mango malformation presented both idiomorphs, *MAT1-1* and *MAT1-2*, while in mahogany only *MAT1-2* was present. The results of this research indicated that *F. mexicanum* and *F. pseudocircinatum*, previously reported in Mexico as causal agents of mango malformation disease (MMD), also cause malformation disease on big-leaf mahogany. This is the first report of this new disease and the first time *F. mexicanum* was shown to affect a host other than mango. In addition, it is the first time that the genetic diversity of *F. mexicanum* was studied and the results highlight the need to determine if this pathogen is reproducing sexually in mango, which is important for the management of the disease.

Key words: β-tubulin, *RPB1*, *TEF1*, rDNA, phylogeny, ISSRs, Mating Types, tropical tree diseases, *S. macrophylla, M. indica*, witches brooms**.**

Introducción general

Especies de *Fusarium* causantes de enfermedades en cultivos agrícolas

Las especies de *Fusarium* se encuentran entre los patógenos de mayor importancia económica de cultivos agrícolas a nivel mundial (Summerell et al., 2010). Aproximadamente el 80% de las especies vegetales cultivadas presentan al menos una enfermedad causada por *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). La diversidad de enfermedades incluyen pudrición de raíces, coronas y tallos, cancros, tizón de semillas y espigas, marchitez vascular (Summerell y Leslie, 2011) y malformación de brotes florales y vegetativos (Marasas et al., 2006), incluyendo agallas (Ploetz y Freeman, 2009). La malformación ha sido reportada para mango (*Mangifera indica* L.) causada por varias especies de *Fusarium* (Marasas et al., 2006).

Fusarium agente causal de la malformación del mango

El mango es uno de los cultivos tropicales más ampliamente cultivados a nivel mundial (Raj et al., 2017). Los principales países productores de mango son India, China, Tailandia, Pakistan, México, Indonesia, Brasil, Bangladesh, Filipinas, Nigeria y Egipto (FAOSTAT, 2017), en orden de mayor a menor. La enfermedad malformación del mango (MMD por sus siglas en inglés) se conoce desde finales del siglo diecinueve en la India (Ploetz, 2001). En los inicios de la segunda mitad del siglo XX, investigadores de ese país demostraron que aislados de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de mango eran los agentes causales de la enfermedad (Summanwar et al., 1966; Varma et al., 1974). Posteriormente, se confirmó que la enfermedad es causada por varias especies del género *Fusarium*

(Freeman et al., 1999; Ibrahim et al., 1975; Manicom, 1989; Ploetz y Gregory, 1993). Los taxa de *Fusarium* reportados como causantes o asociados con síntomas de malformación del mango, presentan características morfológicas muy similares, por lo que han sido agrupadas en el complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*.

Las especies causantes de MMD son *F. mangiferae* Britz, M. J. Wingf. & Marasas (Britz et al., 2002) reportada en África del Sur, China, Egipto, España, Florida (USA), India, Israel, Malasia, Omán y Sri Lanka (Freeman et al., 2014a); *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas & M. J. Wingf. detectado en África del Sur (Britz et al., 2002) y Brasil (Lima et al., 2012); *F. mexicanum* T. Aoki, S. Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz & O'Donnell descrito en México (Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2008); *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg reportado en China (Zhan et al., 2010); *F. tupiense* Lima, Pfenning & Leslie inicialmente reportado en Brasil (Lima et al., 2012) y posteriormente en Senegal (Senghor et al., 2012) y España (Crespo et al., 2016); y *F. pseudocircinatum* Nirenberg & O'Donnell inicialmente reportado en México (Freeman et al., 2014b) y posteriormente en República Dominicana (García-López et al., 2016).

En México, la enfermedad se ha detectado en todas las zonas donde se cultiva el mango (Prieto et al., 2005) y es la principal enfermedad del cultivo en huertas comerciales, reduciendo los rendimientos hasta en un 70% (Noriega, 1996). Estudios realizados en la región centro occidente de México indican que *F. mexicanum* es el patógeno prevalente ocasionando malformación en huertas de

mango (Betancourt-Resendes et al., 2012; Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2012; Soto-Plancarte et al., 2015).

Caracterización de las especies de *Fusarium* causantes de MMD

Los caracteres morfológicos que se utilizan para la identificación de las especies de *Fusarium* son principalmente la forma y tamaño de los macro y microconidios, y la presencia o ausencia de clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006; Kvas et al., 2009). Sin embargo, el uso de caracteres morfológicos para separar especies en este complejo no ha sido útil, ya que son pocos los caracteres utilizables (Kvas et al., 2009) y los taxa son similares morfológicamente.

Por lo cual, los análisis multilocus de secuencias de ADN han revolucionado el conocimiento de la diversidad de especies y las relaciones filogenéticas dentro del género *Fusarium* (Aoki et al., 2014). Así, mientras que Gerlach y Nirenberg (1982) describieron aproximadamente 80 especies usando caracteres morfológicos; en la actualidad, el uso del análisis multilocus ha incrementado el número de especies de *Fusarium* aproximadamente a 300, agrupadas en 22 complejos (Aoki et al., 2014; Laurence et al., 2015; Moussa et al., 2017).

El análisis filogenético de la secuencia del ADN que codifica para el gen factor de elongación 1-α (*TEF1*) ha sido una herramienta útil para la identificación de las especies del género *Fusarium*. Las secuencias de este gen están disponibles en el GenBank y en la base de datos FUSARIUM-ID (Geiser et al., 2004). Otros genes importantes que se han utilizado para realizar análisis filogenéticos son el gen de beta tubulina (β-Tub) y los genes de la primera y segunda subunidades grandes de la ARN polimerasa II (RPB1 y RPB2), los cuales han mostrado ser eficientes para

analizar las relaciones evolutivas de los taxa de *Fusarium* asociados a malformación (Skovgaard et al., 2001; Kim et al., 2005; Vitale et al., 2011).

Malformación causada por *Fusarium* en otras especies vegetales en México

En un estudio llevado a cabo en los estados de Colima y Michoacán (Soto Plancarte, 2013), se detectaron plantas silvestres y ornamentales de los géneros *Bursera, Senna, Swietenia* y *Tabebuia,* con síntomas de malformación. Los resultados del estudio mostraron que *Fusarium* se encontraba asociado con los tejidos malformados colectados.

La caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla* King) es una especie vegetal maderable neotropical de alto valor comercial. El precio de la madera de caoba registrado en 1995 fue de aproximadamente $700.00 dólares por metro cúbico (Verissimo et al., 1995). En México, fue reportado un precio de aproximadamente 5,000 pesos por metro cúbico de madera de cedro y caoba en aserraderos (CONAFOR, 2017). Debido a su alto valor la caoba es explotada de forma intensiva y actualmente se ha llegado casi a su extinción en América Central (Lemes et al., 2003).

Diversidad genética en fusaria causantes de malformación

A pesar de la importancia de la enfermedad, poco es conocido sobre la ecología de los patógenos y su manejo efectivo. El estudio de la diversidad genética de las poblaciones de un patógeno provee ideas sobre su biología y evolución, con lo cual se favorecen las estrategias para el manejo de la enfermedad (Milgroom y Peever, 2003). Algunas de las herramientas genéticas y moleculares que han sido empleadas de forma satisfactoria para analizar la diversidad genética de las

especies de *Fusarium* causantes de MMD incluyen, los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) (Lima et al., 2009; Crespo et al., 2016) y polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (AFLP) para *F. tupiense* (Lima et al., 2009), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (O´Donnell et al., 1998; Crespo et al., 2016), secuencias internas repetidas simples (ISSR) para *F. mangiferae* (Liu et al., 2014), y la identificación de los idiomorfos de compatibilidad sexual realizados en *F. sterilihyphosum* (Britz et al., 2002). Entre estos marcadores moleculares, los ISSR generan bandas reproducibles debido a la longitud del oligonucleótido utilizado y a la elevada temperatura de alineamiento; mientras que los RAPD son una técnica sencilla de realizar, pero con baja reproducibilidad y poder de discriminación; los AFLP tienen un alto poder en el análisis de polimorfismos, pero la técnica es laboriosa, requiere múltiples pasos y el costo de los reactivos y del equipo es elevado (Akbari et al., 2018). A la fecha, en *F. mexicanum* la diversidad genética únicamente ha sido estudiada empleando GCV (Betancourt-Resendes et al., 2010; González Jiménez et al., 2012; Rodríguez-Alvarado et al., 2012), detectándose solamente cinco GCV en huertas comerciales de mango en los estados de Colima, Jalisco y Michoacán, lo cual indicó una baja diversidad genética, sugiriendo que el patógeno se encuentra como poblaciones clónales. Sin embargo, en esos estudios únicamente se utilizaron 34 aislados. Estudios adicionales sobre diversidad genética y estructura de poblaciones de *F. mexicanum* deben ser realizados.

Justificación

Conocer la diversidad genética y la filogenia de las especies de *Fusarium* de la región centro-occidente de México, causantes de malformación en cultivos de interés agronómico y maderable como son el mango (*Mangifera indica*) y la caoba (*Swietenia macrophylla*), contribuirá al manejo de la enfermedad.

Hipótesis

Los aislados de *Fusarium* obtenidos de malformación de caoba (*S. macrophylla*) son filogenéticamente idénticos a los aislados de malformación de mango *(M. indica*) y son capaces de causar malformación en condiciones de invernadero.

Existe diversidad genética entre los aislados de *Fusarium* obtenidos de malformación de caoba y los de malformación de mango.

Objetivo general

Caracterizar los aislados de *Fusarium* obtenidos de malformación de caoba, determinar las relaciones filogenéticas, la patogenicidad y su diversidad genética.

Objetivos específicos

1. Identificar las especies de *Fusarium* asociadas a malformación de caoba.
2. Analizar las relaciones filogenéticas de los aislados de *Fusarium* obtenidos de malformación de caoba.
3. Determinar la patogenicidad de las especies de *Fusarium* obtenidas de malformación de caoba en plántulas de caoba producidas en invernadero.
4. Analizar la diversidad genética de los aislados de *Fusarium* provenientes de malformación de caoba.

Capítulo I. Artículo aceptado para su publicación en la revista Plant Disease https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0060-RE

A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. (Una nueva enfermedad de caoba de hoja grande causada por dos especies de *Fusarium* en México)

R. Santillán-Mendoza, S. P. Fernández-Pavía, Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Michoacán 58880, México; **K. O'Donnell,** Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, USDA-ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL 61604; **R. C. Ploetz,** Department of Plant Pathology, Tropical Research and Education Center, University of Florida, 18905 SW 280th Street, Homestead 33031-3314; **R. Ortega-Arreola,** Campo Experimental Tecomán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Tecomán, Colima 28100, México**; G. Vázquez-Marrufo,** Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, FMVZ**,** UMSNH, Km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Michoacán 58880, México; **J. Benítez-Malvido,** Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Ex Hacienda de San José de la Huerta, Morelia, Michoacán 58190, México; **J. C. Montero-Castro,** Facultad de Biología, UMSNH, Cd. Universitaria, Morelia, Michoacán 58060, México; **A. Soto-Plancarte, y G. Rodríguez-Alvarado**,

Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH, Km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Michoacán 58880, México.

Autor de correspondencia: G. Rodríguez-Alvarado; e-mail: gra.labpv@gmail.com

La mención de productos y nombres comerciales en esta publicación son solamente para el propósito de proveer información específica y no implica la aprobación por el Departamento de Agricultura U.S. USDA es empleador y proveedor de oportunidades iguales.

Resumen

Santillán-Mendoza, R., Fernández-Pavía, S. P., O'Donnell, K., Ploetz, R. C., Ortega-Arreola, R., Vázquez-Marrufo, G., Benítez-Malvido, J., Montero-Castro, J. C., Soto-Plancarte, A, Rodríguez-Alvarado, G. 2018. **Una nueva enfermedad de caoba de hoja grande causada por dos especies de *Fusarium* en México**. Plant Dis. La caoba de hoja grande, *Swietenia macrophylla*, es una planta valiosa debido a la calidad superior de su madera y a su uso ornamental en áreas urbanas en México. Durante investigaciones en zonas productoras de mango en la región centro occidente de México, fueron observados en árboles de caoba de hoja grande síntomas de malformación, la enfermedad más importante del mango en el área. Los objetivos de esta investigación fueron describir esta enfermedad nueva y determinar su causa. Los síntomas en caoba de hoja grande en cuatro sitios en Michoacán, México, son parecidos a los que se presentan en la fase vegetativa de la malformación del mango, incluyendo el crecimiento agrupado y compacto de las yemas apicales y laterales, con entrenudos severamente acortados y hojas

pequeñas enrolladas hacia atrás. De los 163 aislados que fueron recuperados de tejidos sintomáticos, la mayoría fueron identificados como *Fusarium pseudocircinatum* (N = 121) y *F. mexicanum* (N = 39) usando datos moleculares; dos aislados representaban filoespecies sin nombre dentro del complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti* (FIESC 20-d y FIESC 37-a) y otro aislado se ubicó en el complejo de especies de *F. solani* (FSSC 25-m). Sin embargo, solamente *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* indujeron síntomas de malformación en plántulas de 14 días de edad de caoba de hoja grande. Los resultados indican que *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*, previamente reportados en México como agentes causales de la malformación de mango (MMD), también afectan a la caoba de hoja grande. Este es el primer reporte de esta enfermedad nueva y la primera vez que se ha mostrado que *F. mexicanum* afecta un hospedante diferente al mango.

Palabras clave: ISSRs, β-tubulina, *RPB1*, *TEF1*, rADN, filogenia, enfermedades de árboles tropicales, *Swietenia macrophylla*.

Antecedentes

La malformación es una de las enfermedades más importantes del mango, *Mangifera indica* L., en el ámbito mundial (Ploetz, 2001). La enfermedad malformación del mango (MMD) afecta partes vegetativas del árbol y, a través del impacto que tiene en las flores, reduce el establecimiento y rendimiento de frutos (Ploetz y Freeman, 2009). La enfermedad es causada por diversas especies en el complejo de especies de *F. fujikuroi* (FFSC) (O'Donnell et al., 1998). Estas especies incluyen a *F. mangiferae* Britz, M. J. Wingf. & Marasas (Britz et al., 2002) reportada

en China, Egipto, Florida (USA), India, Israel, Malasia, Omán, África del Sur, España, y Sri Lanka (Freeman et al., 2014a); *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas & M. J. Wingf. detectado en África del Sur (Britz et al., 2002) y Brasil (Lima et al., 2012); *F. mexicanum* T. Aoki, S. Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz & O'Donnell descrito en México (Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2008); *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg reportado en China (Zhan et al., 2010); *F. tupiense* Lima, Pfenning & Leslie inicialmente reportado en Brasil (Lima et al., 2012), y posteriormente en Senegal (Senghor et al., 2012) y España (Crespo et al., 2016); y *F. pseudocircinatum* Nirenberg & O'Donnell inicialmente reportado en México (Freeman et al., 2014b) y posteriormente en República Dominicana (García-López et al., 2016). Los síntomas foliares y vegetativos que son inducidos en mango por estas especies son similares (Cohen et al., 2017). Los síntomas incluyen deformación de panículas florales con ejes primarios y secundarios acortados, un incremento en el número de flores masculinas y flores hermafroditas estériles, y entrenudos acortados con hojas pequeñas quebradizas (Ploetz y Freeman, 2009).

A la fecha, solamente *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* han mostrado ser los agentes causales de MMD en México, aunque otras especies han sido aisladas de tejidos malformados (Otero-Colina et al., 2010). *Fusarium mexicanum*, representado por unos pocos linajes clonales, fue el más prevalente en huertas de mango y viveros comerciales de mango en la región centro occidente del país (Betancourt-Resendes et al., 2012; Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2012; Soto-Plancarte et al., 2015). A pesar de la importancia de MMD en

México, se conoce poco sobre la ecología de los patógenos y métodos de manejo efectivos. Aunque dos de los agentes de MMD, *F. proliferatum* y *F. pseudocircinatum*, afectan hospedantes múltiples (Abdalla et al., 2000; Elmer, 1995; Logrieco et al., 1995; Nirenberg y O´Donnell, 1998; Ocamb et al., 2002), otras especies que causen MMD (*F. mangiferae*, *F. sterilihyphosum*, *F. mexicanum* y *F. tupiense*) solamente afectan al mango.

El gobierno mexicano recientemente proporcionó incentivos económicos para incrementar la producción de madera de alto valor en el país, incluyendo caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) (CONAFOR, 2017). Sin embargo, a pesar del interés en incrementar la producción se conoce poco acerca de los factores que impactan este importante árbol. Con la excepción de la palomilla barrenadora del brote, *Hypsipyla grandella* Zeller (Pérez-Salicrup y Esquivel, 2008; Rodan et al., 1992), se ha publicado muy poca información sobre los problemas que afectan a esta especie. Diversos hongos han sido aislados de árboles de una especie relacionada, *S. mahagoni* L. (Jacq.) (caoba de las Indias Occidentales), algunos de los cuales estaban asociados con “agallas” o “escoba de bruja” (Alfieri et al., 1994; Farr et al., 1989). Sin embargo, no hay reportes que indiquen que alguno de esos hongos haya sido probado como patógeno de este árbol.

Tres especies neotropicales geográficamente separadas e interfértiles son reconocidas en el género *Swietenia*: (i) caoba de hoja grande está distribuída de manera natural del centro de México, a través de América Central, hasta la parte sur de la cuenca del Amazonas en Bolivia y Brasil (Mayhew y Newton, 1998; Rodan et al., 1992); (ii) caoba de la costa del Pacífico, *S. humilis* Zuccarini, es endémica a

la costa del Pacífico de América Central; y (iii) caoba de las Indias Occidentales es nativa de Cuba, Española, Jamaica, Bahamas y los Cabos de Florida (USA) (Rodan et al., 1992). De esas especies, caoba de hoja grande tiene el más alto valor comercial (Rodan et al., 1992). Desafortunadamente, ha sido explotada extensivamente en América Central y América del Sur (Gillies et al., 1999). Reducciones drásticas en las poblaciones de caobas de hoja grande y de la costa del Pacífico han ocurrido durante los últimos 60 años en Costa Rica (Navarro et al., 2003), causando preocupación por el estado de la conservación de la caoba de hoja grande, lo que resultó en su inclusión en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional en Especies de la Flora y Fauna en Peligro de Extinción (CITES) en 2003 (Grogan y Barreto, 2005).

Descubrimos síntomas de malformación en caoba de hoja grande en áreas productoras de mango en la región centro occidente de México en el 2012. En este estudio, describimos esta enfermedad no reconocida previamente. Reportamos información sistemática molecular usada para identificar las especies de *Fusarium* que estaban asociadas con esta enfermedad, y discutimos la realización de los postulados de Koch para dos de las especies, *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum*.

Materiales y Métodos

Sitios de colecta y estrategia de muestreo. Durante el 2014 y 2015, árboles de caoba de hoja grande con síntomas de malformación fueron muestreados en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Los sitios de colecta estaban adyacentes a zonas productoras de mango en Apatzingán (19°00´31.4´´N, 102°13´45.5´´O), Parácuaro (19°04´10.8´´N, 102°14´56.5´´O),

Gabriel Zamora (19°05´34.3´´N, 102°03´28.1´´O) y La Huacana (18°57´18.6´´ N, 101°48´21.6´´ O) (Fig. 1). Las cuatro áreas de colecta tienen una temperatura promedio anual de 28ºC, el promedio de precipitación tiene un rango de 476 a 600 mm, y la altura media sobre el nivel del mar tiene un rango de 392 a 600 m (INEGI, 2009). Tejidos malformados (Fig. 2), de 5 a 10 cm en diámetro, fueron cortados de los cuatro sectores equidistantes de cada árbol muestreado y almacenados en hielo en bolsas de plástico etiquetadas para transportarlas al laboratorio. También se tomaron muestras de las puntas de ramas sanas de árboles de caoba de hoja grande sin síntomas de malformación, en los sitios de colecta de Parácuaro y Gabriel Zamora.

Aislamientos de tejidos malformados de árboles de caoba de hoja grande. Aislados de hongos fueron obtenidos utilizando protocolos publicados previamente (Soto-Plancarte et al., 2015). Muestras de tejido de 2.0 cm^2 fueron cortadas de áreas sin necrosis de cada una de las cuatro malformaciones tomadas de cada árbol, se mezclaron y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml (Corning, Corning, NY) que contenían 20 ml de agua más 1% de detergente en polvo (Roma, Fábrica de Jabón La Corona, Xalostoc, MX) por 10 min para remover polvo e insectos, se sumergieron en 0.6% hipoclorito de sodio por 1 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, se secaron en papel estéril. A continuación, se cortaron 10 a 12 trozos de tejidos de 5 mm^2 de las muestras desinfestadas, los cuales fueron transferidos a cajas Petri 100 x 15 mm con medio Peptona-PCNB-Agar (PPA) (Leslie y Summerell, 2006) suplementado con 0.7 g/L ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 10 mg/L rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las

cajas fueron colocadas a 25ºC por 24 a 48 h. Las colonias de hongos que emergieron fueron transferidas a cajas con medio agar agua al 2%, incubadas en oscuridad por 48 h, y purificadas transfiriendo puntas de hifas a cajas Petri con medio sintético bajo en nutrientes (SNA, Nirenberg y O'Donnell, 1998). Los aislados fueron incubados bajo luz negra y blanca fría a 25ºC por 7 días para inducir esporulación. Se recuperaron 163 aislados de *Fusarium* que fueron almacenados a -80ºC en glicerol al 15% en el laboratorio de Kerry O'Donnell o depositados en la Colección de Cultivos ARS (NRRL), Peoria, IL en donde están disponibles si son solicitados (https://nrrl.ncaur.usda.gov/).

Extracción de ADN genómico. La mata micelial de cultivos estáticos crecidos en caldo papa dextrosa (25ºC) por 7 días, fueron compactadas centrifugando por 3 min, y lavadas con agua destilada estéril. El ADN fue extraído usando un procedimiento con CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) descrito por Leslie y Summerell (2006) con modificaciones. Brevemente, el micelio molido fue incubado en buffer de lisis a 65ºC por 1 h, y etanol absoluto fue usado en lugar de isopropanol (2-propanol). La concentración del ADN fue determinada en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA).

Análisis de Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR). Secuencias Repetidas Simples Internas (ISSRs) fueron analizadas para los 163 fusaria que fueron recuperados, utilizando los siguientes tres oligonucleótidos que fueron diseñados por Liu et al., (2014): 809, 812 y 891. Cepas representativas de los siguientes MMD patógenos fueron incluidos como referencias en el análisis ISRR:

F. mangiferae (CML 409), *F. mexicanum* (MXMIC-698), *F. sterilihyphosum* (CML 280), y *F. tupiense* (CML 345). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 13 µl usando GoTaq Hot Start (Promega, Madison, WI), 100 pmol de un oligonucleótido ISSR, y 3 µl de ADN (12 ng/µl). Las reacciones de PCR fueron hechas en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hauppauge, NY) usando el programa siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, y 72°C por 2 min. La amplificación terminó con un paso final de elongación a 72°C por 7 min. Cinco µl de los productos de la reacción fueron analizados en geles de agarosa al 2% y corridos electroforéticamente a 50 volts por 100 min, teñidos con bromuro de etidio y entonces visualizados usando un transiluminador UV (UVP, Lab-Tech, Guadalajara, MX).

Análisis de PCR para tipos de apareamiento. Los idiomorfos del tipo de apareamiento (*MAT*) fueron determinados con los oligonucleótidos GFmat1a y GFmat1b (*MAT1-1*) y Gfmat2c y Gfmat2d (*MAT1-2*) reportados por Steenkamp et al., (2000). Los amplicones de *MAT1-1* y *MAT1-2* generados con los oligonucleótidos fueron de 200 pb y 800 pb, respectivamente.

Identificación filogenética molecular multilocus de los aislados de hongos. Micelio de los aislados crecidos en caldo malta levadura fue colectado después de 3-4 días, secado bajo congelación y procesado con un protocolo CTAB para extraer ADN genómico (Gardes y Bruns, 1993). Porciones del factor de elongación de la traducción 1-α (*TEF1*), la subunidad más grande de la ARN polimerasa (*RPB1*), beta-tubulina (β-tub), y la región espaciadora transcrita interna

del ribosoma nuclear (ITS rADN) y el extremo 5´ de la subunidad grande del ribosoma nuclear (LSU rADN) fueron amplificadas por PCR y secuenciadas como se describió previamente (O'Donnell et al., 2010; O'Donnell y Cigelnik, 1997; White et al., 1990). Los amplicones fueron secuenciados con BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), purificados con BigDye Xterminator y electroforesados en un analizador genético ABI 3730. Los cromatogramas de las secuencias fueron editados con Sequencher 5.2.4 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI), exportados como archivos NEXUS, y editados manualmente para mejorar los alineamientos antes de llevar a cabo el análisis filogenético de máxima verosimilitud (MV) y máxima parsimonia (MP), con PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) y GARLI 2.01 (Zwickl, 2006), respectivamente. Las secuencias de ADN fueron depositadas en el GenBank NCBI con los números de accesión KX870032-KX870045, KX912230-KX912243, y MG838022-MG838111.

Experimentos de patogenicidad. Las semillas de frutos maduros de árboles de caoba de hoja grande colectados en Gabriel Zamora, fueron removidas y almacenadas a 25ºC. El ala y tegumentos externos fueron removidos antes de incubar las semillas en contenedores de plástico con papel estéril húmedo bajo luz blanca fría a 25ºC. La mayoría de semillas germinó entre 4 y 6 días.

Los aislados fueron cultivados en SNA a 25ºC bajo luz fluorescente negra y blanca continua por 14 días. Plántulas de 14 días de edad fueron sumergidas en una suspensión de conidios de cada aislado a una concentración de 4.9 x 10^6 conidio/ml por 12 h a 25°C, antes de ser plantadas en macetas con una mezcla estéril de peat moss y perlita (1:1). Las plantas fueron mantenidas a 25°C bajo un

fotoperiodo de 8:16 oscuridad/luz por 1 semana, y entonces transferidas a un invernadero e inspeccionadas regularmente por síntomas por 4 meses. La identidad de los aislados de *Fusarium* que fueron recuperados de las plantas sintomáticas fue determinada secuenciando una porción de *TEF1*. Debido a que las plántulas no inoculadas no desarrollaron síntomas, y *Fusarium* spp. no fue recuperado de los controles negativos, las plantas no mostraron estar infectadas de manera latente por estos patógenos antes de las inoculaciones. El experimento se llevó a cabo dos veces.

Resultados

Sintomatología de la malformación vegetativa de caoba de hoja grande. De los 280 árboles de caoba de hoja grande que fueron inspeccionados en cuatro sitios en Michoacán, México, fueron observados síntomas de malformación en brotes laterales y terminales (Fig. 2) en 49 árboles. Todos los árboles se encontraban cerca de huertas comerciales de mango en las cuales algunos de estos árboles frutales mostraban síntomas de MMD. Un gran número de yemas afectadas ocurría en brotes laterales dentro del follaje de árboles sintomáticos de caoba de hoja grande; las yemas se incrementaban en tamaño y posteriormente se desarrollaban en una masa de tejido del cual emergían ramificaciones numerosas con entrenudos acortados, hojas pequeñas y deformadas y ocasionalmente, unas pocas hojas normales. Inicialmente, los tejidos malformados eran verdes, pero posteriormente se volvían café oscuro, necróticos y leñosos. Malformación floral no fue observada.

Genotipificación de aislados de *Fusarium* asociados con la enfermedad malformación de caoba de hoja grande. Los oligonucleótidos 809 y 891 produjeron cada uno 10 bandas únicas, mientras que el oligonucleótido 812 produjo ocho. Patrones de bandeado específicos para especies fueron obtenidos para *F. mangiferae*, *F. mexicanum*, *F. pseudocircinatum*, *F. sterilihyphosum*, y *F. tupiense* (Fig. Suplementaria S1). El análisis ISSR indicó que 121 de los aislados fueron *F. pseudocircinatum* y 39 fueron *F. mexicanum*; el resto de los tres aislados representaban especies distintas.

Filogenia molecular. Búsquedas BLASTn en *Fusarium MLST* (http://www.westerdijkinstitute.nl/fusarium/), usando secuencias parciales *TEF1* confirmó la identificación ISSR que indicaba que 121 aislados fueron *F. pseudocircinatum* y 39 fueron *F. mexicanum*. Adicionalmente, los aislados MICMW-32.6b y MICMW-32.8b fueron agrupados dentro del complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) mientras que MICMW-30.1 se agrupó en el complejo de especies de *F. solani* (FSSC). Esquemas de tres locus previamente publicados para FIESC (O'Donnell et al., 2009) y FSSC (O'Donnell et al., 2008) revelaron que MICMW-32.6b y MICMW-32.8b fueron, respectivamente, *Fusarium* sp. FIESC 20-d y FIESC 37-a, y MICMW-30.1 fue *Fusarium* sp. FSSC 25-m. Para evaluar si los aislados identificados como *F. pseudocircinatum* y *F. mexicanum* vía ISSR fueron identificados correctamente, 16 de los aislados de caoba fueron examinados en un análisis filogenético molecular de cuatro locus que incluyó las cepas ex-tipo de *F. pseudocircinatum* NRRL 22946 y *F. mexicanum* NRRL 53147 junto con 10 aislados previamente caracterizados de esas especies. El análisis filogenético molecular de

máxima verosimilitud y máxima parsimonia de los cuatro conjuntos de secuencias individuales y combinadas confirmó las identificaciones obtenidas usando genotipificación por ISSR (Fig. 3).

Idiomorfos de tipos de compatibilidad. Los idiomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2* fueron detectados en los 19 aislados de *F. pseudocircinatum* y en siete de *F. mexicanum* que fueron analizados. Cuatro aislados de *F. mexicanum* recuperados de caoba de hoja grande en Michoacán fueron *MAT1-2*, así como dos aislados obtenidos de mango. Tipificación de los 19 aislados de *F. pseudocircinatum* reveló que 12 fueron *MAT1-1* y seis fueron *MAT1-2*; sin embargo, el idiomorfo MAT de la cepa NRRL 25738 no pudo ser determinado. De los siete *F. mexicanum* analizados, solamente la cepa ex-tipo NRRL 53147 de Michoacán fue *MAT1-1*.

Pruebas de patogenicidad en plántulas de caoba de hoja grande. Síntomas de tejidos malformados en plántulas inoculadas de caoba de hoja grande fueron observados inicialmente 4 semanas después de la inoculación, pero solamente en el cuello de las plántulas (Fig. 4). Los aislados de *F. pseudocircinatum* de caoba de hoja grande de Gabriel Zamora (Fig. 4 B-C) y Parácuaro indujeron malformación, pero tres aislados de Apatzingán no produjeron síntomas. Todos los aislados de *F. mexicanum* (Fig. 4 D-E) recuperados de caoba de hoja grande y dos de mango (Soto-Plancarte et al., 2015) indujeron síntomas en caoba de hoja grande. Las yemas malformadas que se formaban debajo de la línea del suelo eran inicialmente blancas, pero se tornaron verdes al crecer posteriormente sobre la línea del suelo. Yemas nuevas malformadas continuaron emergiendo hasta que el experimento terminó 16 semanas después de la inoculación. Síntomas no se

desarrollaron en plantas inoculadas con las tres filosespecies no nombradas y los controles negativos (Cuadro 1). Información de las secuencias parciales *TEF1*, la cual es ampliamente usada para identificar *Fusarium* spp. por medio de consultas BLASTn en *Fusarium MLST* (O'Donnell et al., 2010), confirmó que los aislados recuperados de los tejidos malformados fueron los mismos que los usados para inocular las plantas, por lo tanto, completando los postulados de Koch. Las plantas inoculadas con las tres filosespecies no nombradas y las plantas control fallaron en desarrollar síntomas.

Discusión

Este es el primer reporte de una nueva enfermedad de caoba de hoja grande, malformación, y sus agentes causales, *Fusarium mexicanum* y *F. pseudocircinatum*, los cuales también causan MMD en México. Los postulados de Koch fueron exitosamente completados con aislados de esas especies recuperados de árboles sintomáticos de las siguientes localidades en Michoacán (Fig. 4 B-F): *F. mexicanum* de Gabriel Zamora y La Huacana, y *F. pseudocircinatum* de Gabriel Zamora y Parácuaro. Adicionalmente, dos aislados MMD de *F. mexicanum* de un estudio previo (Soto-Plancarte et al., 2015) también indujeron síntomas de malformación en plántulas de caoba de hoja grande. Algunos aislados de estas dos especies indujeron síntomas en plántulas 4 semanas después de la inoculación (*F. mexicanum* MICMW-32.13a, MICMW-65.1, MXMIC-692 y MXMIC-698, y *F. pseudocircinatum* MICMW-32.11a), mientras que otros aislados requirieron 4 meses para incitar síntomas visibles.

Aislados de las tres filoespecies no nombradas, *Fusarium* spp. FIESC 20-d, FIESC 37-a y FSSC 25-m, recuperadas de caoba de hoja grande con malformación no fueron patogénicos en nuestro estudio (Cuadro 1). Especies dentro del FIESC son reportadas típicamente incorrectamente como *F. equiseti* en la literatura fitopatológica y en GenBank (O'Donnell et al., 2015), pero el nombre *F. equiseti* debe ser utilizado únicamente para FIESC 14 con base en secuenciación multilocus de la cepa ex-neotipo, NRRL 26149 (= CBS 307.94). Similarmente, las más de 60 especies en FSSC son reportadas típicamente en estudios de investigación como *F. solani*, como es recomendado por Leslie y Summerell (2006); sin embargo, con su reciente epitificación (Schroers et al., 2016), el nombre *F. solani* debe ser usado solamente para filoespecies FSSC 5.

MV y MP bootstrapping (BS) del conjunto de secuencias de los cuatro locus parece soportar fuertemente la exclusiva genealogía de *F. pseudocircinatum*, en que los 19 aislados de esta especie que fueron analizados formaron grupos compactos en los árboles individuales de los genes *RPB1*, rADN y β-tubulina (información no mostrada). Sin embargo, es importante notar que tres cepas de esta especie poseían alelos *TEF1* inusualmente divergentes (MICMW-31.16 y 32.11a de caoba de hoja grande y NRRL 25034 del Hemíptero *Heteropsylla incisa* de Nueva Guinea Papua) (Fig. 3). Además, debido a que los alelos *RPB2* de siete de los aislados de *F. pseudocircinatum* fueron altamente divergentes, este conjunto de secuencias no fue incluido en el estudio presente porque podrían ser no ortólogos. Estos hallazgos realzan la necesidad de estudios que determinen si los alelos no ortólogos putativos son debido a hibridación intraespecífica, como ha sido postulado

para fusaria cultivados por escarabajos ambrosiales dentro del complejo de especies de *F. solani* (Kasson et al., 2013) y patógenos de cereales que producen la toxina tricoteceno dentro del complejo de especies de *F. graminearum* (O'Donnell et al., 2000). Si ha ocurrido introgresión híbrida en *F. pseudocircinatum*, podría estar mediada por cepas femeninas altamente fértiles. Esto realza la necesidad de determinar si este patógeno se está reproduciendo sexualmente en estos hospedantes, lo cual tiene implicaciones prácticas para el manejo de la enfermedad dado que patógenos que sexualmente recombinan tienen más probabilidad de superar la resistencia del hospedante que los que se reproducen asexualmente solamente (Covert et al., 2007; McDonald y Linde, 2002).

Notamos similitudes entre los síntomas que reportamos aquí y los síntomas atribuidos a *Fusarium decemcellulare* Brick. Este patógeno se le encuentra asociado con agallas de muchos árboles subtropicales y tropicales (Alfieri et al., 1994), principalmente mango (Ploetz, 2003) y cacao (*Theobroma cacao*) (Ploetz, 2007). Las agallas hemisféricas en estos hospedantes que se desarrollan en los nudos de las hojas y en heridas en las ramas principales o tronco están compuestas de muchas yemas pequeñas (puntos verdes), la mayoría de los cuales se pierden cuando la agalla madura (Hansen, 1963; Ploetz, 2003).

Los resultados del presente estudio sugieren que *F. mexicanum* es la principal causa de la malformación del mango en México. Debido a que no ha sido detectado fuera de este país (Betancourt-Resendes et al., 2012; Otero-Colina et al., 2010), especulamos que *F. mexicanum* estuvo asociado con una planta nativa en México, pero hizo un brinco de hospedante después de que el mango fue

introducido de las Filipinas durante finales del siglo 16 (Litz, 2009). Esta hipótesis es soportada por información filogenética que coloca a *F. mexicanum* en el clado americano (Otero-Colina et al., 2010) propuesta por O'Donnell et al., (1998). Son necesarios estudios futuros de plantas nativas herbáceas y leñosas para incrementar nuestro entendimiento del rango de hospedantes y distribución geográfica de los patógenos de la caoba de hoja grande, y para proporcionar más información sobre los orígenes de estos y otros patógenos importantes de árboles y plantas cultivadas.

Agradecimientos

R. Santillán-Mendoza agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proveer una beca doctoral (No. 258550). Agradecemos al Dr. Ludwig H. Pfenning por proveer cepas (CML = Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil), y a Alfredo Reyes-Tena, Cristina Montoya-Martínez y Daniela Pineda-Vaca, por su asistencia técnica experta. También agradecemos la asistencia experta de Gail Doehring y Nathane Orwig por la generación de las secuencias de ADN reportadas en este estudio.

Literatura citada

Abdalla, M. Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., and Mulè, G. 2000. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. Plant Dis. 84:321–324.

Alfieri, S. A., Jr., Langdon, K. R., Kimbrough, J. W., El-Gholl, N. E., and Wehlburg, C. 1994. Diseases and Disorders of Plants in Florida. Bull. No. 14. Division of Plant Industry. Gainesville, FL.

Betancourt-Resendes, I., Velázquez-Monreal, J. J., Montero-Castro, J. C., Fernández-Pavía S. P., Lozoya-Saldaña, H., and Rodríguez-Alvarado, G. 2012. *Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico. Rev. Mex. Fitopatol. 30:115–127.

Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., and Wingfield, M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia 94:722–730.

Cohen, Y., Belausov, E., Maymon, M., Elazar, M., Shulman, I., Saada, D., Shtienberg, D., and Freeman, S. 2017. *Fusarium mangiferae* localization *in planta* during initiation and development of mango malformation disease. Plant Pathol. 66:924–933.

CONAFOR. 2017. Plantaciones Forestales Comerciales. Available online at: http://www.conafor.gob.mx/web/temas-forestales/plantaciones-forestales/

Covert, S. F., Aoki, T., O'Donnell, K., Starkey, D., Holliday, A., Geiser, D. M., Cheung, F., Town, C., Strom, A., Juba, J., Scandiani, M., and Yang, X. B. 2007. Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. Fungal Genet. Biol. 44:799–807.

Crespo, M., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Maymon, M., Freeman, S., Aoki, T., O´Donnell, K., Torés, J. A., and de Vicente, A. 2016. Analysis of genetic diversity of *Fusarium tupiense*, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. Plant Dis. 100:276–286.

Elmer, W. H. 1995. A single mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium proliferatum*) predominates in asparagus fields in Connecticut, Massachusetts, and Michigan. Mycologia 87:68–71.

Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P., and Rossman, A. Y. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press, St. Paul, MN.

Freeman, S., Shtienberg, D., Maymon, M., Levin, A. G., and Ploetz, R. C. 2014a. New insights into mango malformation disease epidemiology lead to a new integrated management strategy for subtropical environments. Plant Dis. 98:1456–1466.

Freeman, S., Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T., and O'Donnell, K. 2014b. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. Plant Dis. 98:1583.

García-López, E., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Villegas-Monter, A., Tovar-Pedraza, J. M., Serra, C., and Batista-Marte, C. M. 2016. First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. Plant Dis. 100:1501.

Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:112–118.

Gillies, A. C. M., Navarro, C., Lowe, A. J., Newton, A. C., Hernandez, M., Wilson, J., and Cornelius, J. P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of

mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity 83:722–732.

Grogan, J., and Barreto, P. 2005. Big-leaf mahogany on CITES Appendix II: big challenge, big opportunity. Conserv. Biol. 19:973–976.

Hansen, A. J. 1963. The role of *Fusarium decemcellulare* and *Fusarium roseum* in the green-point cushion gall complex of cacao. Turrialba 13:80–87.

INEGI. 2009. Available online at: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/-datos_geograficos/16/16006.pdf

Kasson, M. T., O'Donnell, K., Rooney, A. P., Sink, S., Ploetz, R. C., Ploetz, J. N., Konkol, J. L., Carrillo, D., Freeman, S., Mendel, Z., Smith, J. A., Black, A. W., Hulcr, J., Bateman, C., Stefkova, K., Campbell, P. R., Geering, A. D. W., Dann, E. K., Eskalen, A., Mohotti, K., Short, D. P. G., Aoki, T., Fenstermacher, K. A., Davis, D. D., and Geiser, D. M. 2013. An inordinate fondness for *Fusarium*: Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. Fungal Gen. Biol. 56:147–157.

Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA.

Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Abreu, L. M., and Leslie, J. F. 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. Mycologia 104:1408–1419.

Litz, R. E. 2009. Mango. Pages 163-174 in: Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts, Part 5. C. Kole and T. C. Hall, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA.

Liu, F., Weia, J., Zhan, R., Oub, X., and Chang, J. 2014. Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango. Sci. Hortic. 165:352–356.

Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A., and Corda, P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. Plant Dis. 79: 727–731.

McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40:349–379.

Mayhew, J. E., and Newton, A. C. 1998. The Silviculture of Mahogany. CABI Publishing, Oxford. Wallingford, UK.

Navarro, C., Wilson, J., Gillies, A., and Hernández, M. 2003. A new Mesoamerican collection of big-leaf mahogany. Pages 103–117 in: Big Leaf Mahogany: Genetics, Ecology and Management, Ecological Studies. A. E. Lugo, J. C. Figueroa and M. Alayón M, eds. Springer Science & Business Media, New York.

Nirenberg, H. I., and O´Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:434–458.

Ocamb, C. M., Juzwik, J., and Martin, F. B. 2002. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. New Forest 24: 67-79.

O´Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol. Phyl. Evol. 7:103–116.

O´Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:465–493.

O´Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., and Casper, H. H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:7905–7910.

O´Donnell, K., Sutton, D. A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M. G., Brandt, M. E., Zhang, N., and Geiser, D. M. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. J. Clin. Microbiol. 46:2477–2490.

O´Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W., and Geiser, D. M. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. J. Clin. Microbiol. 47:3851–3861.

O´Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Sarver, B. A. J., Balajee, S. A., Schroers, H.-J., Summerbell, R. C., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y.-H., Kang, S., Park, B., and Geiser, D. M. 2010. Internet-accessible DNA sequence database for

identifying fusaria from human and animal infections. J. Clin. Microbiol. 48:3708–3718.

O´Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., and Kang, S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. Phytoparasitica 43:583–595.

Otero-Colina, G., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Maymon, M., Ploetz, R. C., Aoki, T. A., O'Donnell, K., and Freeman, S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. Phytopathology 100:1176–1184.

Pérez-Salicrup, D., and Esquivel, R. 2008. Tree infection by *Hypsipyla grandella* in *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata* (Meliaceae) in Mexico's southern Yucatan Peninsula. For. Ecol. Manage. 255:324–327.

Ploetz, R. C. 2001. Malformation: A unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. Pages 233–247 in: *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse and W. L. Bryden, eds. APS Press, St Paul, MN.

Ploetz, R.C. 2003. Diseases of mango. Pages 327-363 in: Diseases of Tropical Fruit Crops. R.C. Ploetz, ed. CAB International, Wallingford, UK.

Ploetz, R. C. 2007. Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. Phytopathology 97:1634–1639.

Ploetz, R. C., and Freeman, S. 2009. Foliar, Floral and Soilborne Diseases. Pages 231–301 in: The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. R. E. Litz, ed. CAB International, Homestead, FL.

Rodan, B. D., Newton, A. C., and Verissimo, A. 1992. Mahogany conservation: status and policy initiatives. Environ. Conserv. 19:331–338.

Rodríguez-Alvarado, G., Betancourt-Resendes, I., Rodríguez-Fernández, R., Velázquez-Monreal, J. J., Fernández-Pavía, S. P., and Gómez-Dorantes, N. 2012. Vegetative compatibility groups characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation in Jalisco, Mexico. Rev. Mex. Fitopatol. 30:128–140.

Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C., and Valenzuela-Vázquez, M. 2008. A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico. Plant Pathol. 57:181.

Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Zhang, N., Short, D. P. G., Juba, J., and Geiser, D. M. 2016. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 108:806–819.

Senghor, A. L., Sharma, K., Kumar, P. L., and Bandyopadhyay, R. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium tupiense* in Senegal. Plant Dis. 96:1582.

Soto-Plancarte, A., Santillán-Mendoza, R., Fernández-Pavía, S. P., Ploetz, R. C., Freeman, S., Ortega-Arreola, R., Osuna-Ávila, P., Velázquez-Monreal, J. J.,

and Rodríguez-Alvarado, G. 2015. Mango nurseries as sources of *Fusarium mexicanum,* cause mango malformation disease in central western Mexico. Phytoparasitica 43:427–435.

Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Zeller, K. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O., and Leslie, J. F. 2000. PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Appl. Environ. Microbiol. 66:4378–4382.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0a150. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315–322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.

Zhan, R. L., Yang, S. J., Ho, H. H., Liu, F., Zhao, Y. L., Chang, J. M., and He, Y. B. 2010. Mango malformation disease in south China caused by *Fusarium proliferatum*. J. Phytopathol. 158:721–725.

Zwickl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence data sets under the maximum likelihood criterion. GARLI 2.01. Available online at: https://www.phylo.org.

Cuadro 1. Pruebas de patogenicidad en plántulas de caoba de hoja grande usando cepas de *Fusarium* asociadas con la enfermedad malformación en Michoacán, México.

Fusarium	**Cepa**	**Hospedante**	**Sitio de Colecta**	**Plantas inoculadas con síntomas [a]**
Fusarium sp. FIESC 37-a	MICMW-32.8b	*S. macrophylla*[c]	Gabriel Zamora	0/10
Fusarium sp. FIESC 20-d	MICMW-32.6b	*S. macrophylla*	Apatzingán	0/10
F. mexicanum	MICMW-32.13a	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	4/10
F. mexicanum	MICMW-60.1	*S. macrophylla*	La Huacana	3/10
F. mexicanum	MICMW-65.1	*S. macrophylla*	La Huacana	6/10
F. mexicanum	MXMIC-692[b]	*M. indica*[d]	Parácuaro	4/10
F. mexicanum	MXMIC-698[b]	*M. indica*	Parácuaro	8/10
F. pseudocircinatum	MICMW-26.6	*S. macrophylla*	Parácuaro	3/10
F. pseudocircinatum	MICMW-32.11a	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	2/10
F. pseudocircinatum	MICMW-30.2	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	3/10
F. pseudocircinatum	MICMW-25.5	*S. macrophylla*	Apatzingán	0/10
F. pseudocircinatum	MICMW-25.16	*S. macrophylla*	Apatzingán	0/10
F. pseudocircinatum	MICMW-32.6b	*S. macrophylla*	Apatzingán	0/10
Fusarium sp. FSSC 25-m	MICMW-30.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	0/10

[a]112 días después de las inoculaciones; [b]Soto-Plancarte et al., (2015); [c]*Swietenia macrophylla*; [d]*Mangifera indica*

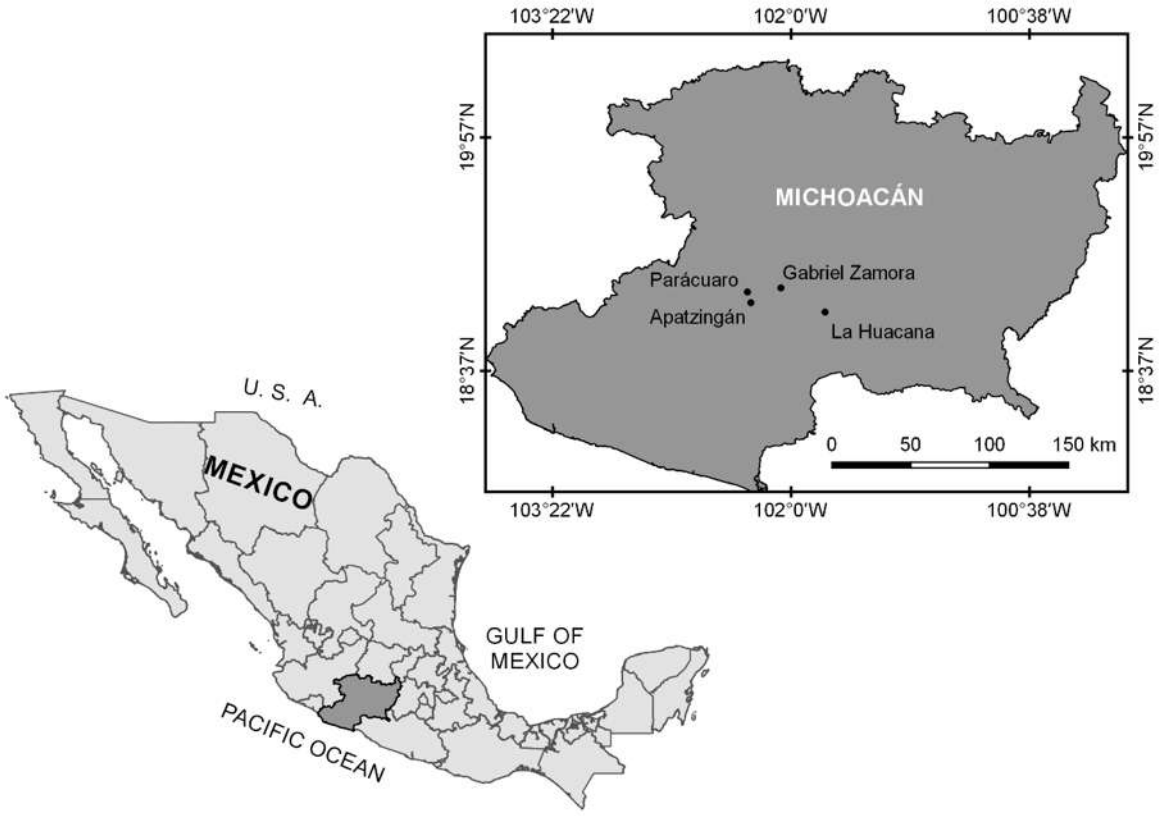


Figura 1. Mapa de Michoacán, México, mostrando las áreas donde se colectaron muestras de árboles de caoba de hoja grande con síntomas de malformación. Michoacán está localizado en la región centro occidente de México.

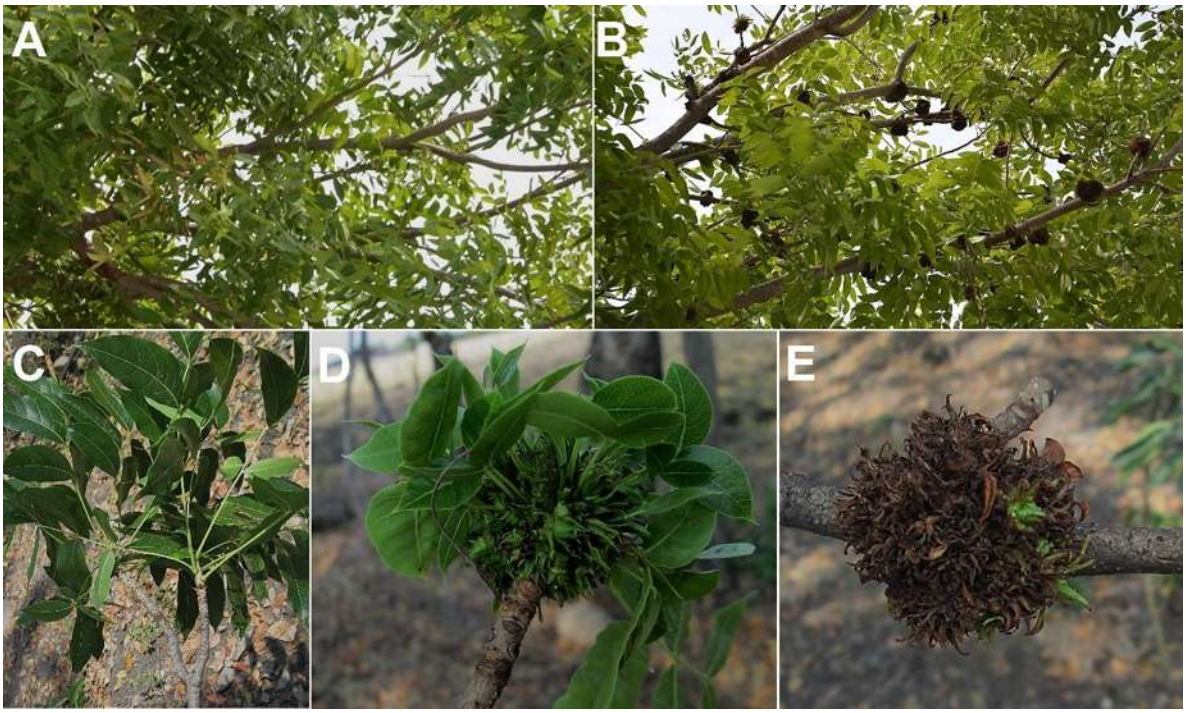


Figura 2. Síntomas de malformación en árboles de caoba de hoja grande. **A,** Árboles de caoba de hoja grande con ramas asintomáticas. **B,** Ramas con malformación vegetativa. **C,** Rama con brotes laterales y terminales sanos. **D,** Rama joven con malformación vegetativa. **E,** Rama madura con malformación vegetativa.

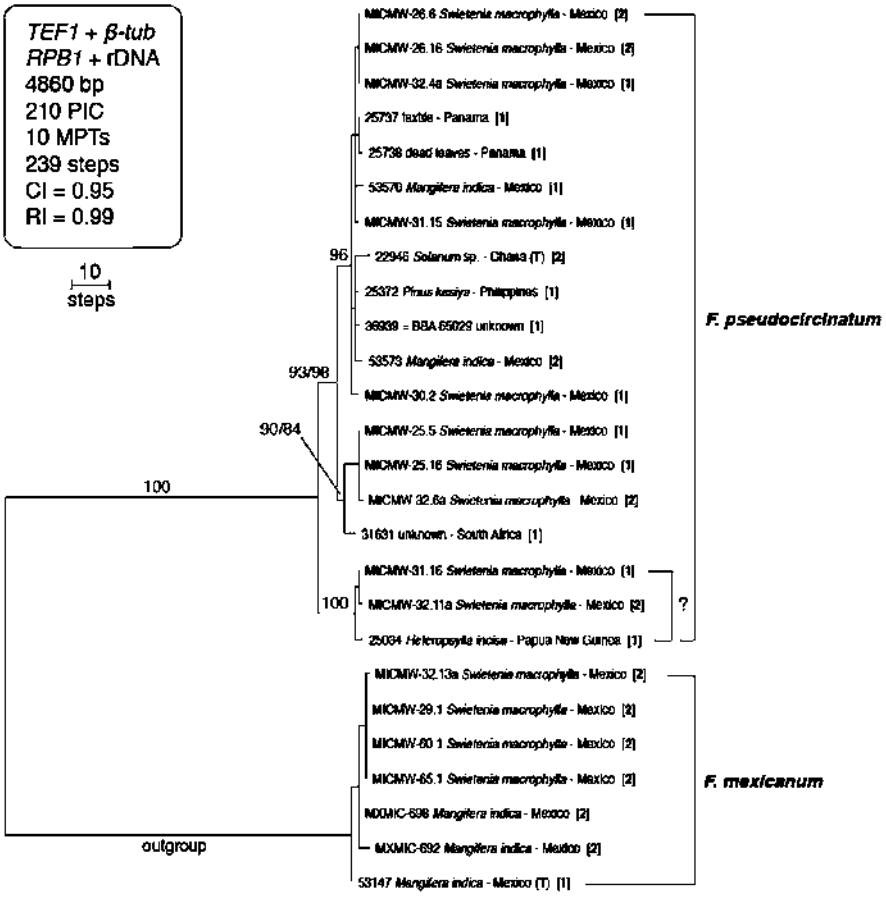


Figura 3. Árbol filogenético de Máxima Parsimonia. Uno de 10 árboles más parsimoniosos (MPTs) inferido de 4 conjuntos de secuencias enraizado en el punto central. Valores bootstrap de máxima verosimilitud (ML-BS) ≥ 70% están indicados arriba de los nodos con base en 1000 pseudoreplicas. El valor bootstrap de máxima parsimonia solamente se muestra cuando difería del valor ML por > 5% (ML-BS/MP-BS). Resultados del análisis de PCR para los idiomorfos *MAT1-1* (1) y *MAT1-2* (2) están indicados en la filogenia. BBA, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Berlin, Alemania; CI, índice de consistencia; MICMW y MXMIC, Colección de Hongos, LabPV-UMSNH; NRRL, Colección de Cultivos ARS, Peoria, IL; PIC, caracteres informativos de parsimonia; RI, índice de retención; T, cepa ex-tipo.

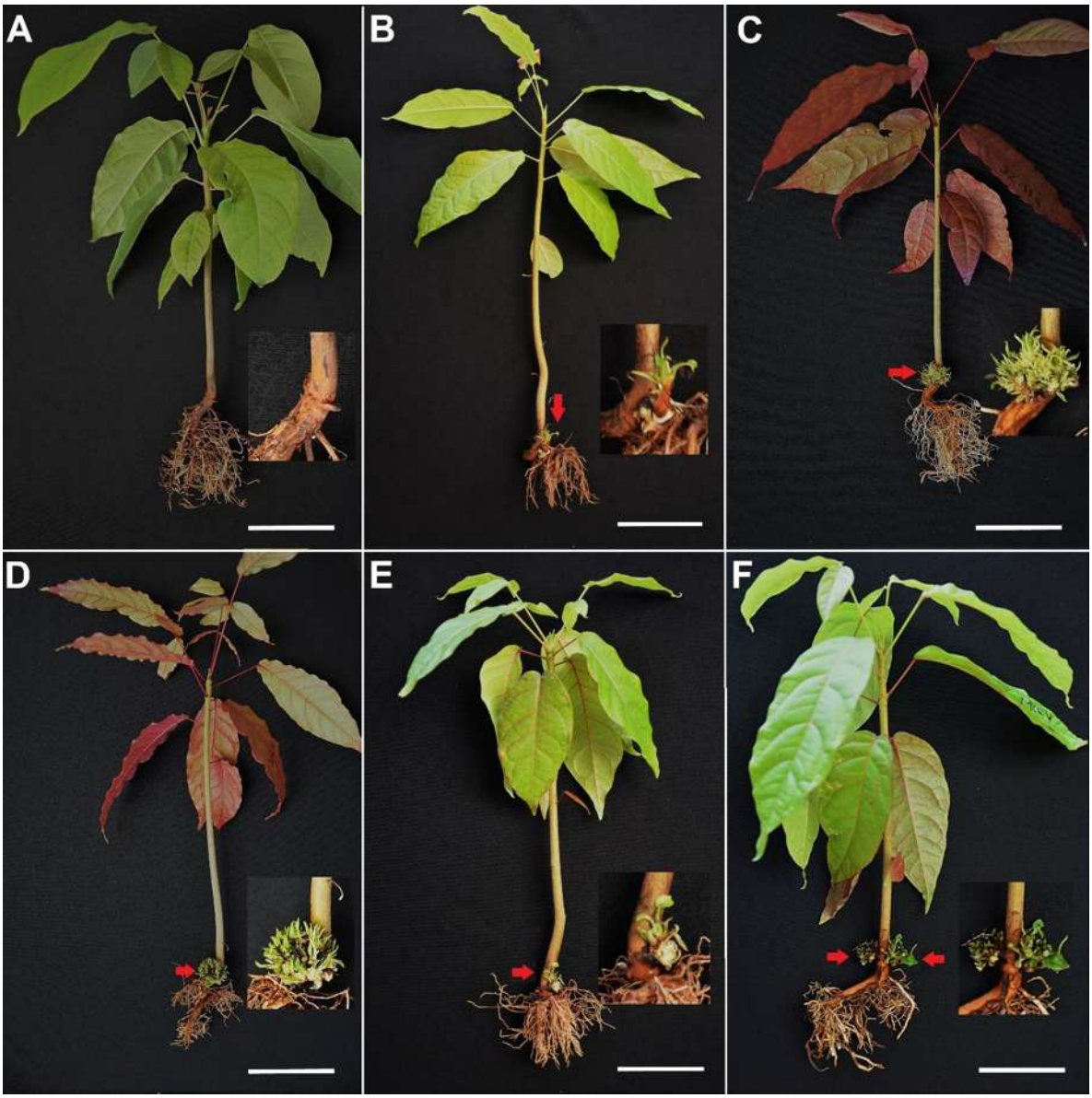


Figura 4. Pruebas de patogenicidad. Plántulas de caoba de hoja grande exhibiendo síntomas de malformación 112 días después de ser inoculadas. **A,** Control negativo inoculado con agua destilada estéril. **B,** Inoculado con *F. pseudocircinatum* MICMW-30.2. **C,** Inoculado con *F. pseudocircinatum* MICMW-32.11a. **D,** Inoculado con *F. mexicanum* MICMW-32.13a. **E,** Inoculado con *F. mexicanum* MICMW-65.1. **F,** Inoculado con *F. mexicanum* MXMIC-698. Las flechas indican brotes vegetativos malformados. Barra = 5 cm. Recuadro = 3X.

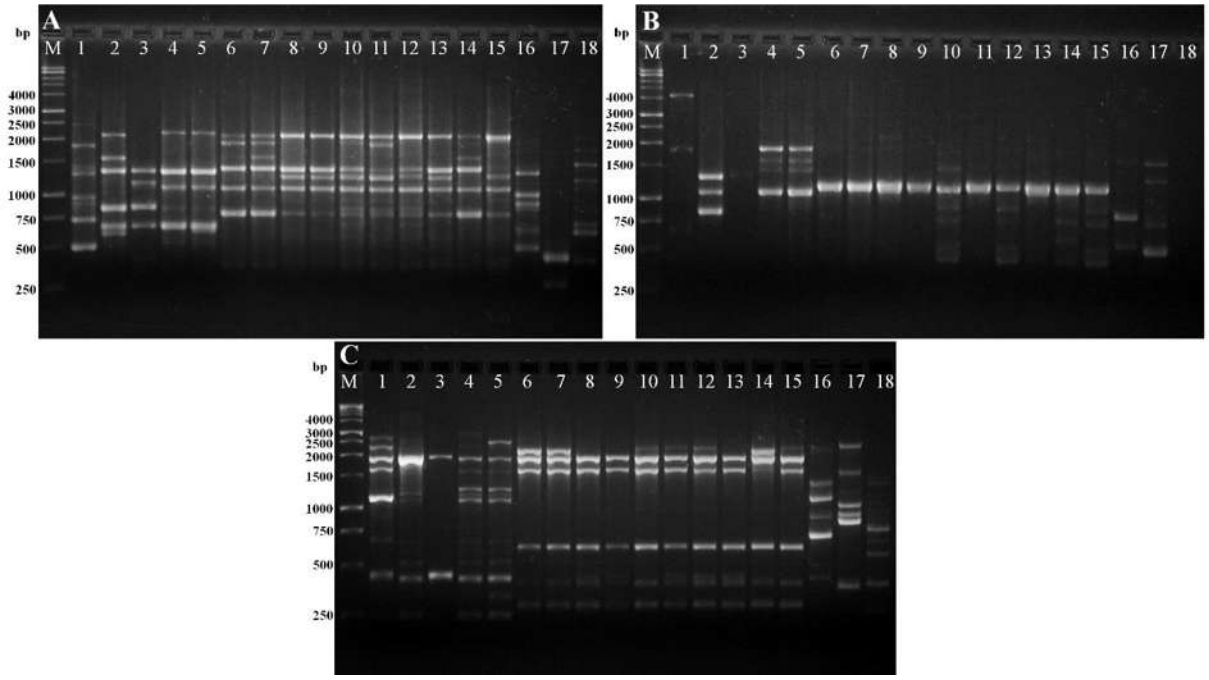


Fig. Suplementaria S1. Patrones ISSR de aislados de *Fusarium* recuperados de árboles de caoba de hoja grande con la enfermedad malformación. **A,** Oligonucleótido 809 [$(AG)_8G$]. **B,** Oligonucleótido 812 [$(GA)_8A$]. **C,** Oligonucleótido 891 [HVH $(TG)_7$] (Liu et al., 2014). Carriles: **M**, marcador de peso molecular 1 kb. **1**, *F. mangiferae* CML409. **2**, *F. sterilihyphosum* CML280. **3**, *F. tupiense* CML345. **4**, *F. mexicanum* MXMIC-698. **5**, *F. mexicanum* MICMW-32.13a. Carriles **6** a **15** Aislados de *F. pseudocircinatum* **6**, MICMW-25.5. **7**, MICMW-25.16. **8**, MICMW-26.6. **9**, MICMW-26.16. **10**, MICMW-30.2. **11**, MICMW-31.15. **12**, MICMW-31.16. **13**, MICMW-32.4a. **14**, MICMW-32.6a. **15**, MICMW-32.11a. **16**, *Fusarium* sp. FIESC 20-d. MICMW-32.6b. **17**, *Fusarium sp.* FIESC 37-a. MICMW-32.8b. **18**, *Fusarium* sp. FSSC 25-m. MICMW-30.1. El patrón de bandas para las cepas de *F. mexicanum* MXMIC-692, MICMW-60.1 y MICMW-65.1 fue idéntico a MICMW-32.13a (información no mostrada).

Capítulo II. Artículo preparado para someterse a la revista Molecular Biotechnology https://link.springer.com/journal/12033

Genetic diversity of *Fusarium mexicanum*, causal agent of mango and big-leaf mahogany malformation in Mexico. (Diversidad genética de *Fusarium mexicanum,* agente causal de la malformación de mango y caoba de hoja grande en México).

Resumen

Fusarium mexicanum y *F. pseudocircinatum* son los agentes causales de la enfermedad malformación del mango (MMD) y de la caoba de hoja grande en México. La malformación del mango es la principal enfermedad del cultivo en el país, siendo *F. mexicanum* el principal agente causal. A la fecha, ésta especie únicamente ha sido reportada en México, y es la especie prevalente en viveros y huertas comerciales de mango de la región centro occidente. Además, en caoba de hoja grande, la enfermedad ha sido detectada en esas mismas regiones productoras de mango. El objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad genética de aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba mediante secuencias internas repetidas simples (ISSR). Un total de 61 aislados de *F. mexicanum,* 32 de malformación de mango y 29 de malformación de caoba fueron analizados. Se identificaron molecularmente para su posterior análisis de diversidad genética empleando catorce marcadores ISSR, de los cuales se seleccionaron los cinco que generaron un mayor número de bandas polimórficas. Las huellas

genéticas obtenidas indicaron que existe una diversidad genética mayor entre los aislados provenientes de malformación de mango, en contraste con los aislados obtenidos de malformación de caoba de hoja ancha. Cabe señlar que una localidad mostró una diversidad alta dentro de los aislados de mango. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la diversidad genética es influenciada en mayor grado por el hospedante, mientras que la región geográfica tiene un efecto secundario sobre la diversidad genética de *F. mexicanum*. Por último, el análisis Mating Types (MAT) indicó que los aislados obtenidos de malformación de mango presentan ambos idiomorfos, *MAT1-1* y *MAT1-2*, mientras que en caoba sólo se presentó *MAT1-2*. Esta es la primera vez que se estudia la diversidad genética de *F. mexicanum* y los resultados resaltan la necesidad de determinar si este patógeno se está reproduciendo sexualmente en mango, lo cual es importante para el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Secuencias internas repetidas simples (ISSR), Mating types, escoba de bruja, *Mangifera indica*, *Swietenia macrophylla*.

Introducción

El género *Fusarium* contiene una gran diversidad genética y se distribuye mundialmente en plantas, suelo, agua y hábitats humanos. Actualmente, basados en secuenciación molecular, el número de especies de *Fusarium* asciende a cerca de 300 agrupadas en 22 complejos (Aoki et al., 2014; Laurence et al., 2015; Moussa et al., 2017). Los miembros patógenos de plantas del género causan enfermedades en muchos cultivos de importancia agronómica, provocando pérdidas económicas de millones de dólares anualmente (Al-Hatmi et al., 2016). La diversidad de enfermedades incluye pudrición de raíces, coronas y tallos, cancros, tizón de semillas y espigas, marchitez vascular, agallas y malformación de brotes florales y vegetativos (Marasas et al., 2006; Ploetz y Freeman, 2009; Summerell y Leslie, 2011).

El mango (*Mangifera indica* L.) es una de las especies tropicales más ampliamente cultivadas a nivel mundial (Raj et al., 2017). Los principales países productores de mango son India, China, Tailandia, Pakistan, México, Indonesia, Brasil, Bangladesh, Filipinas, Nigeria y Egipto, en orden de mayor a menor producción (FAOSTAT, 2017). La enfermedad malformación del mango (MMD) afecta brotes vegetativos y florales, con lo cual se reduce la producción y rendimiento del cultivo, esta enfermedad es una de las más importantes del cultivo a nivel mundial (Ploetz, 2001; Ploetz y Freeman, 2009).

Varias especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo *F. fujikuroi* (FFSC) son las responsables de la MMD (O´Donnell et al., 1998). A nivel mundial, *F. mangiferae* Britz, M. J. Wingf. y Marasas (Britz et al., 2002) es la especie prevalente,

y ha sido reportada en todos los continentes donde se cultiva el mango, África (Egipto, Sudáfrica), América (USA), Asia (China, India, Israel, Malasia, Omán y Sri Lanka), Europa (España) y Oceanía (Australia) (Freeman et al., 2014a; Liew et al., 2016); *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas y M. J. Wingf. ha sido detectada en Sudáfrica (Britz et al., 2002) y Brasil (Lima et al., 2012); *F. mexicanum* T. Aoki, S. Freeman, Otero-Colina, Rodríguez-Alvarado, Fernández-Pavía, Ploetz y O'Donnell (Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2008), esta reportada exclusivamente en México; una cuarta especie, *F. tupiense* Lima, Pfenning y Leslie ha sido inicialmente reportada en Brasil (Lima et al., 2012) y posteriormente en Senegal (Senghor et al., 2012) y España (Crespo et al., 2016); por último, *F. pseudocircinatum* Nirenberg y O'Donnell fue primero reportada en México (Freeman et al., 2014b) y posteriormente en República Dominicana (García-López et al., 2016).

La caoba de hoja grande (*Swietenia macrophylla* King) es de gran importancia a nivel mundial y en el continente americano es la especie maderable de mayor valor comercial (Verissimo et al., 1995). Tiene un rango geográfico de distribución amplio que va desde el sur de México hasta la cuenca del Amazonas en Bolivia y Brasil (Mayhew y Newton, 1998; Rodan et al., 1992). Desafortunadamente la sobreexplotación en centro y Sudamérica ha conducido a la reducción drástica de las poblaciones silvestres (Gillies et al., 1999), por lo cual el alto riesgo para la viabilidad de la especie la ha conducido a su inclusión en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestres Amenazadas (CITES) en el 2003 (Grogan y Barreto, 2005).

En lo que respecta a enfermedades de la caoba de hoja grande, hasta hace poco únicamente se conocía la plaga causada por las larvas de la polilla barrenadora, *Hypsipyla grandella* Zeller (Pérez-Salicrup y Esquivel, 2008; Rodan et al., 1992). Sin embargo, recientemente ha sido reportada la enfermedad malformación de caoba causada por las especies *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* en México (Santillán-Mendoza et al., 2018).

A pesar de la importancia de la enfermedad malformación, poco es conocido sobre la ecología de los patógenos y su manejo efectivo. El estudio de la diversidad genética de las poblaciones de un patógeno provee ideas sobre su biología y evolución, favoreciendo un mejor manejo de la enfermedad (Milgroom y Peever, 2003). Algunas de las herramientas genéticas y moleculares que han sido empleadas de forma satisfactoria para analizar la diversidad genética de las especies de *Fusarium* causantes de MMD incluyen, los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) (Lima et al., 2009; Crespo et al., 2016), polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (AFLP) (Lima et al., 2009), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (O´Donnell et al., 1998; Crespo et al., 2016), secuencias internas repetidas simples (ISSR) (Liu et al., 2014), y la identificación de los idiomorfos de compatibilidad sexual (Britz et al., 2002). Entre estos marcadores moleculares, los RAPD son una técnica sencilla de realizar, pero con baja reproducibilidad y poder de discriminación; contrario a estos, los AFLP tienen un alto poder en el análisis de polimorfismos, pero la técnica es laboriosa, requiere múltiples pasos, y el costo de los reactivos y del equipo es elevado (Akbari et al., 2018). Por su parte, los ISSR no presentan esas desventajas, generan bandas

reproducibles debido a la longitud del oligonucleótido utilizado y a la elevada temperatura de alineamiento (Akbari et al., 2018). A la fecha, *F. mexicanum* únicamente ha sido reportado en México y es la especie prevalente en viveros y huertas comerciales de mango en la región centro occidente del país (Betancourt-Resendes et al., 2012; Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2012; Soto-Plancarte et al., 2015). La diversidad entre aislados de *F. mexicanum* fue analizada determinando la presencia de los GCV en Colima, Jalisco y Michoacán (Betancourt-Resendes et al., 2010; González Jiménez et al., 2012; Rodríguez-Alvarado et al., 2012), detectándose solamente cinco GCV, lo cual indicó que *F. mexicanum* estaba presente en esos estados como poblaciones clonales; sin embargo, en esos estudios únicamente se utilizaron 34 aislados y el análisis no permitió determinar aspectos importantes sobre la diversidad genética. Por lo que es necesario llevar a cabo análisis de la diversidad en poblaciones de *F. mexicanum* utilizando técnicas moleculares y con un número mayor de aislados. En el presente estudio, reportamos la existencia de una mayor diversidad genética entre los aislados provenientes de malformación de mango con respecto a los obtenidos de malformación de caoba en tres localidades de Michoacán, México, mediante un análisis ISSR. Además, la mayor diversidad genética existente entre los aislados de mango podría estar dada por reproducción sexual. Futuros estudios son necesarios para mejorar el manejo de la enfermedad.

Materiales y Métodos

Colecta de tejido de mango y caoba con malformación.

Árboles de mango y de caoba de hoja grande con síntomas de malformación fueron muestreados en los municipios de Gabriel Zamora, (19°05´34.3´´N, 102°03´28.1´´W), La Huacana (18°57´18.6´´ N, 101°48´21.6´´W) y Nuevo Urecho (19°12´10.1´´N, 101°51´58.3´´W) en el estado de Michoacán, México (Fig. 1). Las colectas se realizaron entre los años de 2014 a 2016. Los datos climáticos de las tres localidades son: temperatura promedio anual de 28° C, precipitación anual de 476 a 600 mm Hg, y altura media de 392 a 600 msnm (INEGI, 2009). Se colectaron tejidos malformados de los cuatro sectores equidistantes de cada árbol muestreado, con un diámetro de 5 a 10 cm. Los tejidos se almacenaron en bolsas de plástico etiquetadas y se transportaron en hielo al laboratorio.

Obtención de aislados de *Fusarium* a partir de tejido con malformación.

Se siguieron protocolos publicados previamente para la obtención de los aislados a partir de tejido vegetal sintomático (Soto-Plancarte et al., 2015; Santillán-Mendoza et al., 2018). Brevemente, 10 a 12 trozos de tejido de 5 mm^2 desinfestados con jabón y cloro fueron transferidos a cajas Petri 100 x 15 mm con medio Peptona-PCNB-Agar (PPA, Leslie y Summerell, 2006) suplementado con antibióticos [0.7 g/L ampicilina y 10 mg/L rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)]. Las cajas con los explantes se colocaron a 25ºC por 24 a 48 h. Las colonias fúngicas que emergieron fueron transferidas a cajas con medio agar agua al 2%, se incubaron en oscuridad por 48 h y se purificaron transfiriendo puntas de hifas a cajas Petri con medio sintético bajo en nutrientes (SNA, Nirenberg y O'Donnell, 1998). Los aislados se

incubaron a 25ºC por 7 días bajo luz negra y blanca fría para inducir la esporulación, transcurrido el tiempo, se cortaron 6 a 8 discos (9 mm) de medio SNA con micelio, se colocaron en microtubos (1.5 ml) con 700 µl de agua destilada estéril y se almacenaron a 16°C en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Extracción de ADN.

Una alícuota de 50 µl de esporas de cada aislado fue inoculada en caldo papa dextrosa e incubada en forma estática (25°C) por 7 días. El micelio generado fue compactado centrifugando por 3 min a 13,200 rpm y lavado con agua destilada estéril. Se utilizó un protocolo con base en el detergente CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para la extracción de ADN, siguiendo las instrucciones de Leslie y Summerell (2006) con algunas modificaciones. Brevemente, el micelio se molió con nitrógeno líquido y se incubó con el buffer de lisis a 65°C durante 1 h; además, se adicionó etanol absoluto en lugar de isopropanol (2-propanol) para precipitar el ADN. La concentración del ADN fue determinada en un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA).

Identificación molecular de los aislados fúngicos.

Secuencias parciales del gen factor de elongación de la traducción 1-α (*TEF1*) fueron amplificadas por PCR usando los oligonucleótidos EF-1 y EF-2 (O´Donnell et al., 1998). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hauppauge, NY) usando el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min, 35 ciclos

de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, y 72°C por 1.5 min. La reacción finalizó con un paso de extensión a 72°C por 7 min. Las reacciones contenían GoTaq Hot Start (Promega, Madison, WI), 100 pmol de cada oligonucleótido y 3 µl de ADN (12 ng/µl), en un volumen total de 13 µl. Se realizaron corridas electroforéticas de los productos de PCR en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y corridos a 50 volts por 90 min. Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP, Lab-Tech, Guadalajara, MX). Las bandas de interés fueron cortadas y purificadas empleando un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), y enviadas a una compañía externa (Macrogen, Seoul, Korea) para su secuenciación. Los programas PreGap y Gap (http://staden.sourceforge.net) fueron utilizados para obtener las secuencias consenso. Las secuencias fueron depositadas en el NCBI (Cuadro 1) y los porcentajes de identidad se determinaron utilizando el programa BLAST del NCBI [National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)].

Los análisis filogenéticos de Máxima Parsimonia (MP) se realizaron en MEGA7 (Kumar et al., 2016) y la Inferencia Bayesiana (IB) en MrBayes v.3.2 (Ronquist et al., 2012), *F. mangiferae* NRRL 25226 fue utilizado como grupo externo.

Análisis ISSR (Secuencias Internas Repetidas Simples).

Los 61 aislados de *Fusarium* fueron analizados mediante secuencias internas repetidas simples (ISSRs) empleando cinco oligonucleótidos diseñados por Liu et al., (2014), 808, 809, 812, 835 y 891 (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se describió en el apartado de Identificación molecular de los aislados

fúngicos, cambiando la temperatura de alineamiento del oligonucleótido y el tiempo de extensión a 2 min. Se corrieron electroforéticamente cinco µl de los productos de la reacción de PCR en geles de agarosa al 2% a 50 volts por 110 min, teñidos con bromuro de etidio y visualizados utilizando un transiluminador UV (UVP, Lab-Tech, Guadalajara, MX).

Análisis de polimorfismos

Los patrones de bandeo obtenidos con los cinco oligonucleótidos ISSR para cada aislado fueron transformados en una matriz binaria (presencia = 1, ausencia = 0), que se usó para calcular la diversidad genética de cada población, incluido el porcentaje de polimórfismos y la heterocigosidad esperada. La distancia genética fue obtenida siguiendo los métodos de Huff y colaboradores (1993) y Nei (1978). Con el primer tipo de distancia, la estructura genética de las poblaciones fue estimada mediante un análisis molecular de varianza (AMOVA), el cual fue analizado mediante PhiPT (análogo de Fst), obteniendo la significancia por 9999 permutaciones. Para este primer análisis se utilizó el software GenAlEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2006). Los patrones de fragmentos regulares que combinan las huellas genómicas ISSR individuales fueron designados como genotipos multilocus (MG). Para probar si los alelos se recombinan libremente o la reproducción clonal es profusa, se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) con 9999 permutaciones del índice de asociación estandarizado ($\bar{r}$d) (Agapow y Burt, 2001). Mientras que, para evaluar las relaciones entre poblaciones e individuos, se construyó un dendograma mediante el método Neighbor-Joining, empleando las distancias

genéticas de Nei (Nei, 1978), el soporte de las ramas fue obtenido con 9999 réplicas bootstrap con el paquete R POPPR v.2.8 (Kamvar et al., 2014).

Ensayo de PCR para la determinación del tipo de compatibilidad sexual

Los genes de compatibilidad sexual (*MAT*) se determinaron utilizando los oligonucleótidos GFmat1a (GTTCATCAAAGGGCAAGCG) y GFmat1b (TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC) para *MAT1-1*; Gfmat2c (AGCGTCATTATTCGATCAAG) y Gfmat2d (CTACGTTGAGAGCTGTACAG) para *MAT1-2* y las condiciones descritas por Steenkamp y colaboradores (2000), siguiendo las recomendaciones del fabricante de la enzima polimerasa (Hot Start Master Mix Promega). Los productos de PCR se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5 % a 50 volts por 90 min. Los oligonucleótidos para el idiomorfo *MAT1-1* produjeron un fragmento de amplificación de 200 pb, mientras que, los oligonucleótidos para el idiomorfo *MAT1-2* un fragmento de 800 pb.

Resultados

Identificación molecular y análisis filogenético

Basados en análisis preliminares sobre la genotipificación de *F. mexicanum* mediante análisis ISSR (Santillán-Mendoza et al., 2018) y en conjunto con secuencias parciales del gen *TEF1* para 28 aislados de mango y caoba seleccionados aleatoriamente, se obtuvo mediante análisis BLAST que la identidad de los aislados fue *F. mexicanum.* Además, para evaluar si los aislados identificados mediante BLAST se caracterizaron correctamente, los aislados fueron examinados en un análisis filogenético que incluyó la cepa holotipo de *F. mexicanum* NRRL 53147 junto con 10 aislados previamente caracterizados de esa especie. El holotipo

de *F. mangiferae* NRRL 25226 fue utilizado como grupo externo. El análisis filogenético molecular de máxima parsimonia y la inferencia bayesiana de las secuencias confirmó las identidades obtenidas por análisis BLAST y por la genotipificación ISSR (Fig. 2).

Selección de oligonucleótidos ISSR

Un total de catorce oligonucleótidos ISSR fueron analizados para *F. mexicanum* de los cuales se seleccionaron aquellos que generaron un mayor número de bandas (Cuadro 2). Un total de 57 bandas de ADN amplificadas constantemente entre 250 y 2800 pb de longitud fueron generadas con los cinco oligoncucleótidos ISSR seleccionados, entre los cuales hubo un promedio de 82.2% de bandas polimórficas (Cuadro 2).

Análisis y distribución espacial de la variación genética

El oligonucleótido 891 amplificó un mayor número de bandas de ADN y el total de las bandas amplificadas fueron polimórficas (Fig. 3), mientras que el oligonucleótido 835 presentó el menor número de bandas polimórficas (Cuadro 2), en conjunto los cinco oligonucleótidos produjeron 51 bandas informativas, constituyendo 29 genotipos multilocus (datos no mostrados). En general, todas las muestras mostraron baja diversidad genética, aunque los aislados de mango mostraron mayor diversidad genética (28% de polimorfismos; 0.095 de heterocigosidad) que los aislados de caoba de hoja grande (14% de polimorfismos; 0.056 de heterocigosidad), sin embargo, la diversidad genética fue excepcionalmente alta en las muestras obtenidas de mango de Gabriel Zamora (60% de polimorfismos; 0.183 de heterocigosidad) (Cuadro 3).

En promedio, los aislados de caoba presentaron las mayores distancias genéticas con respecto a los aislados de mango de La Huacana (0.2) y las menores distancias respecto a los aislados de mango de Nuevo Urecho (0.12). Todas las comparaciones pareadas se presentan en el Cuadro 4.

El AMOVA indicó que la variación dentro de las poblaciones (Mango-G. Zamora) es significativamente mayor (43%), seguido por la variación entre mango y caoba (34%), mientras que entre las regiones la variación fue menor (22%). La prueba de desequilibrio de ligamiento (LD) con todas las muestras analizadas en conjunto o separadas por hospedante, produjo un $\bar{r}$d en el rango de 0.146 a 0.2, en todos los casos significativa (p=0.0001), indicando que la reproducción clonal prevalece entre las muestras analizadas.

Agrupamientos ISSR

El dendograma producido mediante el análisis Neighbor-Joining basado en el coeficiente de similitud de Nei para la matriz ISSR produjo un agrupamiento que separó de forma clara a los aislados de mango de aquellos de caoba de forma independiente a la localidad, a excepción de los aislados de mango obtenidos de Gabriel Zamora, en donde se produjeron ramas particularmente largas que presentaron una separación genética considerable (Fig. 4).

Determinación del tipo de compatibilidad sexual (*MAT*)

El tipo de compatibilidad sexual, fue analizado para los 61 aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba de hoja grande en Michoacán, los resultados muestran la presencia de ambos idiomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2* en los aislados de malformación de mango de Gabriel Zamora y Nuevo

Urecho, mientras que en los aislados de La Huacana sólo se presentó *MAT1-2,* al igual que en todos los aislados obtenidos de malformación de caoba (Cuadro 1).

Discusión

En el presente estudio se analizó la diversidad genética de 61 aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de malformación de mango (32 aislados) y de caoba de hoja grande (29 aislados) mediante secuencias repetidas simples internas (ISSR). El análisis filogenético molecular de máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana de las secuencias confirmó la identidad de los aislados obtenidas como *F. mexicanum* (Fig. 2). En México, la malformación del mango (MMD) es la principal enfermedad del cultivo, siendo *F. mexicanum* el principal agente causal (Betancourt-Resendes et al., 2012; Otero-Colina et al., 2010; Rodríguez-Alvarado et al., 2012; Soto-Plancarte et al., 2015). Además, en caoba, la enfermedad ha sido detectada en las mismas regiones productoras de mango y es causada por *F. mexicanum* y *F. pseudocircinatum* (Santillán-Mendoza et al., 2018).

Diversas herramientas y procedimientos para determinar la diversidad genética de algunas de las especies de *Fusarium* causantes de MMD, han sido utilizadas entre las que se incluyen GCV (Grupos de Compatibilidad Vegetativa), AFLP, RAPD, idiomorfos *MAT* y análisis ISSR (Betancourt-Resendes et al., 2010; Britz et al., 2002; Crespo et al., 2016; Lima et al., 2009; Lima et al., 2012; Liu et al., 2014; O´Donnell et al., 1998; Rodríguez-Alvarado et al., 2012). Los análisis ISSR presentan ventajas sobre las técnicas RAPD, AFLP, SSR, GCV, como la reproducibilidad dada por la longitud y temperatura de alineamiento del oligonucleótido, el bajo costo, poco tiempo para la obtención de resultados, además

de no requerir equipo especializado (Akbari et al., 2018; Qi et al., 2009; Sudisha et al., 2009; Thangavelu et al., 2009).

La caracterización genética de *F. mexicanum* es esencial para comprender la biología y evolución del patógeno y así diseñar una estrategia de manejo eficiente, con lo cual se busca reducir el impacto de la malformación sobre la productividad del mango y la caoba. Utilizando cinco oligoncucleótidos ISSR, los aislados de *F. mexicanum* generaron un total de 57 bandas de ADN amplificadas constantemente con tamaños de 250 a 2800 pb, entre los cuales hubo un promedio de 82.2% de bandas polimórficas (Cuadro 2). La diversidad genética de *F. mexicanum* dentro de las poblaciones fue significativamente mayor (43%), seguido por la variación entre mango y caoba (34%), mientras que entre las regiones la variación fue menor (22%). En general, se encontró que la diversidad genética de *F. mexicanum* fue baja, coincidiendo con un trabajo previo donde se detectaron únicamente cinco GCV en los estados de Colima, Jalisco y Michoacán (Betancourt-Resendes et al., 2010; González-Jiménez 2012; Rodríguez-Alvarado et al., 2012). Sin embargo, ha sido demostrado para otro agente causal de malformación en mango, *F. mangiferae,* que los grupos inferidos mediante GCV e ISSR no se corresponden entre ellos cuando se analizó la diversidad genética, debido a que aislados agrupados en el mismo GCV aparecieron en diferente grupo ISSR, y aislados del mismo grupo ISSR se encontraron en diferentes GCV (Liu et al., 2014).

La baja diversidad encontrada entre los aislados de *F. mexicanum* en el presente estudio contrasta con el estudio realizado en *F. mangiferae* (Liu et al., 2014), en donde se observó un alto nivel de diversidad genética entre aislados

obtenidos en dos provincias de China y de dos cultivares de mango, lo cual sugiere que la alta diversidad puede estar asociada con la deriva génica, mutaciones dentro de las poblaciones, o como resultado de las estrategias de reproducción sexual de la especie (Lima et al., 2009; Liu et al., 2014; Thangavelu et al., 2012).

Sin embargo, la diversidad genética observada en los aislados obtenidos de mango de Gabriel Zamora fue alta con un 60% de polimorfismos y 0.183 de heterocigosidad (Cuadro 3). Aunque la reproducción clonal parece ser común en las muestras analizadas según el $\bar{r}$d, es posible que la recombinación sexual se lleve a cabo en los aislados de malformación de mango de Gabriel Zamora que presentaron ambos tipos de compatibilidad sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*, Cuadro 1), siendo la reproducción sexual el principal mecanismo que favorece la diversidad genética. Tal como fue reportado por Lima y colaboradores (2012), en Brasil se encontró una alta variación genética que correlacionó con la presencia de ambos idiomorfos *MAT*. Empleando ensayos *in vitro* se determinó la presencia de reproducción sexual y asexual para *F. tupiense*, una especie filogenéticamente relacionada a *F. mexicanum* y que es causante de malformación en mango (Lima et al., 2012).

Aquí analizamos por primera vez la diversidad genética de *F. mexicanum* mediante ISSR, y reportamos la existencia de una mayor diversidad entre los aislados provenientes de malformación de mango con respecto a los obtenidos de malformación de caoba en tres localidades de Michoacán, México. Los resultados obtenidos, resaltan la necesidad de determinar si este patógeno se está reproduciendo sexualmente en estos hospedantes, ya que al menos en mango parece tener el mecanismo necesario para llevarse a cabo la reproducción sexual,

lo cual tiene implicaciones prácticas para el manejo de la enfermedad, dado que los patógenos que se recombinan sexualmente tienen mayor éxito adaptativo.

Agradecimientos

R. Santillán-Mendoza agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarle una beca para estudios de doctorado (No. 258550).

Literatura citada

Agapow P. M., and Burt A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. Mol Ecol Notes. 1:101–102.

Akbari M., Salehi H., and Niazi A. 2018. Evaluation of diversity based on morphological variabilities and ISSR molecular markers in Iranian *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Accessions to select and introduce cold-tolerant genotypes. Mol Biotechnol. 60:259–270.

Al-Hatmi A. M. S., Meis J. F., and de Hoog G. S. 2016. *Fusarium*: Molecular diversity and intrinsic drug resistance. Plos Pathog. 12:e1005464. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005464.

Aoki T., O´Donnell K., and Geiser D. M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J Gen Plant Path. 80:189–201.

Betancourt-Resendes I., Gonzaga-Espíritu J. F., Fernández-Pavía S. P., y Rodríguez-Alvarado G. 2010. Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium sp.* obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) con malformación en Michoacán. Biológicas. 12:135–142.

Betancourt-Resendes I., Velázquez-Monreal J. J., Montero-Castro J. C., Fernández-Pavía S. P., Lozoya-Saldaña H., and Rodríguez-Alvarado G. 2012. *Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico. Rev Mex Fitopatol. 30:115–127.

Britz H., Steenkamp E. T., Coutinho T. A., Wingfield B. D., Marasas W. F. O., and Wingfield M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia. 94:722–730.

Crespo M., Arrebola E., Cazorla F. M., Maymon M., Freeman S., Aoki T., O´Donnell K., Torés J. A. and de Vicente A. 2016. Analysis of genetic diversity of *Fusarium tupiense*, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. Plant Dis. 100:276–286.

FAOSTAT (2017) http://www.fao.org/faostat/ Accessed Sept 2017.

Freeman S., Shtienberg D., Maymon M., Levin A. G., and Ploetz R. C. 2014a. New insights into mango malformation disease epidemiology lead to a new integrated management strategy for subtropical environments. Plant Dis. 98:1456–1466.

Freeman S., Otero-Colina G., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S., Maymon M., Ploetz R. C., Aoki T., and O'Donnell K. 2014b. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. Plant Dis. 98:1583.

García-López E., Mora-Aguilera J. A., Nava-Díaz C., Villegas-Monter A., Tovar-Pedraza J. M., Serra C. and Batista-Marte C. M., 2016. First report of

Fusarium pseudocircinatum causing mango malformation disease in Dominican Republic. Plant Dis. 100:1501.

Gillies A. C. M., Navarro C., Lowe A. J., Newton A. C., Hernández M., Wilson J., and Cornelius J. P. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity. 83:722–732.

González-Jiménez N. N. 2012. Compatibilidad vegetativa en poblaciones de *Fusarium mexicanum* y *Fusarium* sp. # 4 causantes de la malformación del mango en Colima. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Grogan J., and Barreto P. 2005. Big-leaf mahogany on CITES Appendix II: big challenge, big opportunity. Conserv Biol. 19:973–976.

Huff D. R., Peakall R., and Smouse P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. Theor Appl Genet. 86:927–934.

INEGI. 2009. Disponible en línea en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/16/16006.pdf

Kamvar Z. N., Tabima J. F., and Grünwald N. J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ 2:e281. doi:10.7717/peerj.281.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. for bigger datasets. Mol Biol Evol. 33:1870–1874.

Laurence M. H., Walsh J. L., Shuttleworth L. A., Robinson D. M., Johansen R. M., Petrovic T., Vu T. T. H., Burgess L. W., Summerell B. A., and Liew E. C. Y. 2015. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. Fungal Divers. 77:349-366. doi:10.1007/s13225-015-0337.

Leslie J. F., and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA.

Liew E. C. Y., Laurence M. H., Pearce C. A., Shivas R. G., Johnson G. I., Tan Y. P., Edwards J., Perry S., Cooke A. W. and Summerell B. A. 2016. Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. Australas Plant Pathol. 45:547–559.

Lima C. S., Monteir J. H. A., Crespo N. C., Costa S. S., Leslie J. F. and Pfenning L. P. 2009. GCV and AFLP analyses identify the same groups in the casual agents of mango malformation in Brazil. Eur J Plant Path. 123:17–26.

Lima C. S., Pfenning L. H., Costa S. S., Abreu L. M. and Leslie J. F. 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. Mycologia. 104:1408–1419.

Liu F., Weia J., Zhan R., Oub X., Chang J. 2014. Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango. Sci Hortic. 165:352–356.

Marasas W. F. O., Ploetz R. C., Wingfield M. J., Wingfield B. D., and Steenkamp E. T. 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. Phytopathology. 96:667–672.

Mayhew J. E., and Newton A. C. 1998. The Silviculture of Mahogany. CABI Publishing, Oxford. Wallingford, UK.

Milgroom M. G, and Peever T. L. 2003. Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. Plant Dis. 87:608–617.

Moussa T. A. A., Al-Zahrani H. S., Kadasa N. M. S., Ahmed S. A., de Hoog G. S., and Al-Hatmi A. M. S. 2017. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. Antonie Van Leeuwenhoek, 110:819–832.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 23:341–369.

Nirenberg H. I. and O´Donnell K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. 90:434–458.

O'Donnell K., Cigelnik E., and Nirenberg H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. 90:465–493.

Otero-Colina G., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S., Maymon M., Ploetz R. C., Aoki T. A., O'Donnell K. and Freeman S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. Phytopathology. 100:1176–1184.

Peakall R. O. D., and Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Resour. 6:288–295.

Pérez-Salicrup D., and Esquivel R. 2008. Tree infection by *Hypsipyla grandella* in *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata* (Meliaceae) in Mexico's southern Yucatan Peninsula. For Ecol Manag. 255:324–327.

Ploetz R. C. 2001. Malformation: A unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. Pages 233–247 in: *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse and W. L. Bryden, eds. APS Press, St Paul, MN.

Ploetz R. C., and Freeman S. 2009. Foliar, Floral and Soilborne Diseases. Pages 231–301. in: The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. R. E. Litz, ed. CAB International, Homestead, FL.

Qi Y., Xie Y., Zhang X., Pu J., Zhang H., Huang S., and Zhang H. 2009. Molecular and pathogenic variation among isolates of *Corynespora cassiicola*. Mol Biotechnol. 41:145–151.

Raj R. S., Thakur S. V., Vyas Y. S., Patel K. M., Patel P. V., Joshi M. N., Tiagi S. N. and Bagatharia S. B. 2017. Diversity analysis, pathogen load and gene expression studies of mango cultivars infected by mango malformation disease. Plant Growth Regul. 81:117–130.

Rodan B. D., Newton A. C., and Verissimo A. 1992. Mahogany conservation: status and policy initiatives. Environ Conserv. 19:331–338.

Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S. P., Ploetz R. C., and Valenzuela-Vázquez M. 2008. A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico. Plant Pathol. 57:181.

Rodríguez-Alvarado G., Betancourt-Resendes I., Rodríguez-Fernández R., Velázquez-Monreal J. J., Fernández-Pavía S. P., and Gómez-Dorantes N. 2012. Vegetative compatibility groups characterization of *Fusarium mexicanum* causing mango malformation in Jalisco, Mexico. Rev Mex Fitopatol. 30:128–140.

Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A. and Huelsenbeck J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol. 61:539–542.

Santillán-Mendoza R., Fernández-Pavía S. P., O'Donnell K., Ploetz R. C., Ortega-Arreola R., Vázquez-Marrufo G., Benítez-Malvido J., Montero-Castro J. C., Soto-Plancarte A., Rodríguez-Alvarado G. 2018. A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. Plant Dis. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0060-RE.

Senghor A. L., Sharma K., Kumar P. L. and Bandyopadhyay R. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium tupiense* in Senegal. Plant Dis. 96:1582.

Soto-Plancarte A., Santillán-Mendoza R. Fernández-Pavía S. P., Ploetz R. C., Freeman S., Ortega-Arreola R., Osuna-Ávila P., Velázquez-Monreal J. J. and Rodríguez-Alvarado G. 2015. Mango nurseries as sources of *Fusarium mexicanum,* cause mango malformation disease in central western Mexico. Phytoparasitica 43:427–435.

Steenkamp E. T., Wingfield B. D., Coutinho T. A., Zeller K. A., Wingfield M. J., Marasas W. F. O., and Leslie J. F. 2000. PCR-based identification of *MAT-1* and

MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Appl Environ Microbiol. 66:4378–4382.

Sudisha J., Ananda-Kumar S., Thakur R. P., Rao V. P., and Shetty H. S. 2009. Molecular characterization of *Sclerospora graminicola,* the incitant of pearl millet downy mildew using ISSR markers. J Phytopathol. 57:748–755.

Summerell B. A. and Leslie J. F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? Fungal Diver. 50:135–144.

Thangavelu R., Muthu-Kumar K., Ganga-Devi P., and Mustaffa M. M. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolates (*Foc*) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis. Mol Biotechnol. 51:203–211.

Verissimo A. C., Barreto P., Tarifa R. and Uhl C. 1995. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. For Ecol Manag. 72:39–60.

Cuadro 1. Caracterización de aislados de *Fusarium mexicanum* obtenidos de tejido malformado de mango y caoba de hoja grande en Michoacán, México.

Aislado[a]	Hospedero[b]	Origen	Gen Bank *TEF1*	Tipo de compatibilidad	Genotipo[d]
MXMIC-710.1	*M. indica*	Nuevo Urecho	MH287745	*MAT1-1*	1
MXMIC-710.2	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-711.1	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-711.2	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-712.1	*M. indica*	Nuevo Urecho	MH287746	*MAT1-2*	3
MXMIC-712.2	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-713.1	*M. indica*	La Huacana	MH287747	*MAT1-2*	3
MXMIC-713.2	*M. indica*	La Huacana	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-714.1	*M. indica*	La Huacana	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-714.2	*M. indica*	La Huacana	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-715.1	*M. indica*	La Huacana	MH287748	*MAT1-2*	9
MXMIC-715.2	*M. indica*	La Huacana	-	*MAT1-2*	9
MXMIC-716.1	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-716.2	*M. indica*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-717.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-717.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-1*	1
MXMIC-718.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287749	*MAT1-2*	2
MXMIC-718.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287750	*MAT1-2*	3
MXMIC-719.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287751	*MAT1-2*	3
MXMIC-719.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287752	*MAT1-2*	4
MXMIC-720.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-720.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-721.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287753	*MAT1-2*	3
MXMIC-721.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287754	*MAT1-2*	5
MXMIC-722.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-722.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287755	*MAT1-2*	6
MXMIC-723.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287756	*MAT1-2*	7
MXMIC-723.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287757	*MAT1-2*	8
MXMIC-724.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-724.2	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287758	*MAT1-2*	8
MXMIC-725.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MXMIC-726.1	*M. indica*	Gabriel Zamora	MH287759	*MAT1-2*	6
MICMW-29.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	MH287735	*MAT1-2*	3
MICMW-29.5	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-29.9	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-29.12	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-32.13a	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	KX870045[c]	*MAT1-2*	3
MICMW-32.13b	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-32.14b	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3

Cuadro 1. (Continuación).

Aislado[a]	Hospedero[b]	Origen	Gen Bank *TEF1*	Tipo de compatibilidad	Genotipo[d]
MICMW-35.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	MH287736	*MAT1-2*	3
MICMW-37.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-38.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-43.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-43.2	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-43.3	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-43.4	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	MH287737	*MAT1-2*	3
MICMW-45.1	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-45.7	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	MH287738	*MAT1-2*	3
MICMW-45.9	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	-	*MAT1-2*	3
MICMW-45.18	*S. macrophylla*	Gabriel Zamora	MH287739	*MAT1-2*	3
MICMW-47.3	*S. macrophylla*	Nuevo Urecho	MH287740	*MAT1-2*	10
MICMW-47.4	*S. macrophylla*	Nuevo Urecho	MH287741	*MAT1-2*	10
MICMW-47.5	*S. macrophylla*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-2*	10
MICMW-54.1	*S. macrophylla*	Nuevo Urecho	MH287742	*MAT1-2*	3
MICMW-54.2	*S. macrophylla*	Nuevo Urecho	-	*MAT1-2*	3
MICMW-60.1	*S. macrophylla*	La Huacana	MG838034[c]	*MAT1-2*	3
MICMW-61.2	*S. macrophylla*	La Huacana	MH287743	*MAT1-2*	3
MICMW-63.1	*S. macrophylla*	La Huacana	-	*MAT1-2*	3
MICMW-64.1	*S. macrophylla*	La Huacana	MH287744	*MAT1-2*	3
MICMW-65.1	*S. macrophylla*	La Huacana	MG838035[c]	*MAT1-2*	3
MICMW-65.2	*S. macrophylla*	La Huacana	-	*MAT1-2*	3

[a]MXMIC y MICMW = Colección del Laboratrio de Patología Vegetal, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
[b]*M. indica* = *Mangifera indica*; *S. macrophylla* = *Swietenia macrophylla.*
[c]Santillán-Mendoza et al., 2018.
[d]Los genotipos fueron distinguidos basados en los patrones de bandas idénticos usando el oligonucleótido 891.

Cuadro 2. Selección de oligonucleótidos ISSR utilizados para los análisis de diversidad genética de *F. mexicanum* (Liu et al., 2014).

Oligonucleótido	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)	Bandas amplificadas	Porcentaje de polimorfismos	Rango de fragmentos (pb)
808	**$(AG)_8C$**	**52**	**9**	**100**	**500-2000**
809	**$(GA)_8A$**	**52**	**9**	**77.7**	**600-2300**
812	**$(CA)_8T$**	**50**	**13**	**100**	**400-2500**
816	$(CA)_8G$	50	2	-	1500-1900
818	$(CA)_8G$	52	4	-	750-2500
835	**$(AG)_8YC$**	**55**	**9**	**33.3**	**600-2750**
847	$(CA)_8RC$	55	2	-	900-1100
851	$(GT)_8YG$	55	5	-	600-3000
855	$(AC)_8YT$	53	0	-	-
856	$(AC)_8YA$	53	2	-	1000-1800
880	$(GGAGA)_3$	48	3	-	750-1500
881	$(GGGGT)_3$	54	2	-	1500-2000
885	$BHB(GA)_7$	51	4	-	500-1800
891	**$HVH(TG)_7$**	**50**	**17**	**100**	**250-2800**

B = (C, G, T); H = (A, C, T); R = (A, G); V = (A, C, G); Y = (C, T).
Negritas indican los oligonucleótidos seleccionados.

Cuadro 3. Análisis de diversidad genética entre poblaciones de *F. mexicanum* aislados de malformación de mango y caoba de hoja grande en Michoacán.

Población	No. Bandas	No. Bandas privadas	%P	h ± SE	uh ± SE
Caoba-La Huacana	40	3	21.05	0.058 ± 0.015	0.07 ± 0.018
Caoba-G. Zamora	37	0	12.28	0.043 ± 0.016	0.045 ± 0.017
Caoba-Nvo. Urecho	31	0	8.77	0.042 ± 0.018	0.053 ± 0.023
Mango-La Huacana	43	4	17.54	0.060 ± 0.018	0.073 ± 0.022
Mango-G. Zamora	50	7	59.65	0.17 ± 0.025	0.183 ± 0.027
Mango-Nvo.Urecho	41	0	7.02	0.026 ± 0.013	0.03 ± 0.015

%P= porcentaje de loci polimórficos
h= diversidad= 1 - (p^2 + q^2)
Para datos binarios haploides, p= frecuencia de bandas y q= 1-p
uh= diversidad imparcial= (N/(N-1)) * h
SE= error estándar

Cuadro 4. Matriz de población por pares de la distancia genética para los aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba.

Caoba - La Huacana	Caoba - G. Zamora[a]	Caoba - N. Urecho[b]	Mango - La Hucana	Mango - G. Zamora[a]	Mango - N. Urecho[b]	**Poblaciones**
0.000						Caoba-La Huacana
0.040	0.000					Caoba-G. Zamora[a]
0.081	0.069	0.000				Caoba-N. Urecho[b]
0.166	**0.154**	**0.285**	0.000			Mango-La Huacana
0.144	0.156	0.201	0.063	0.000		Mango-G. Zamora[a]
0.088	**0.076**	**0.197**	0.044	0.082	0.000	Mango-N. Urecho[b]

Los aislados de Mango-La Huacana presentaron las mayores distancias genéticas con respecto a los aislados de caoba (marcados en rojo, 0.2 en promedio), y los de Mango-Nuevo Urecho presentaron las menores distancias (marcados en azul, 0.12 en promedio).

[a]G. Zamora= Gabriel Zamora.

[b]N. Urecho= Nuevo Urecho.

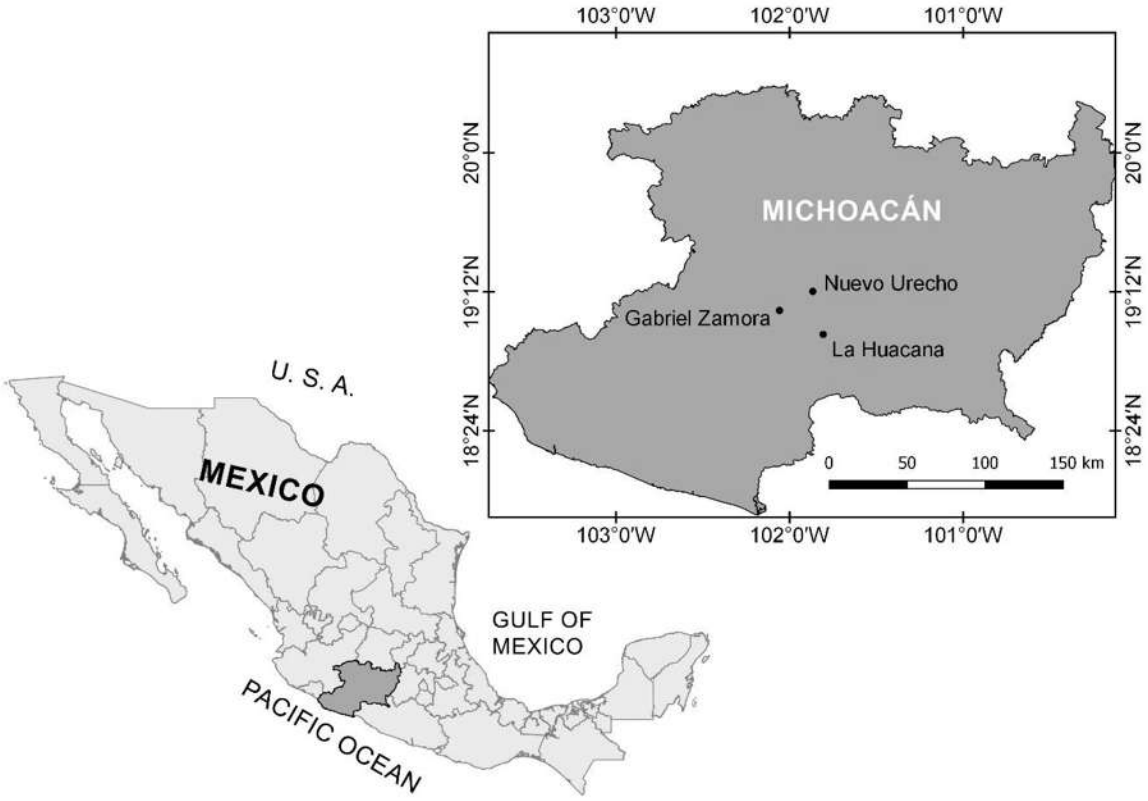


Figura 1. Mapa de Michoacán, México, mostrando las áreas donde se colectaron muestras de árboles de mango y caoba de hoja grande con síntomas de malformación. Michoacán está localizado en la región centro occidente de México.

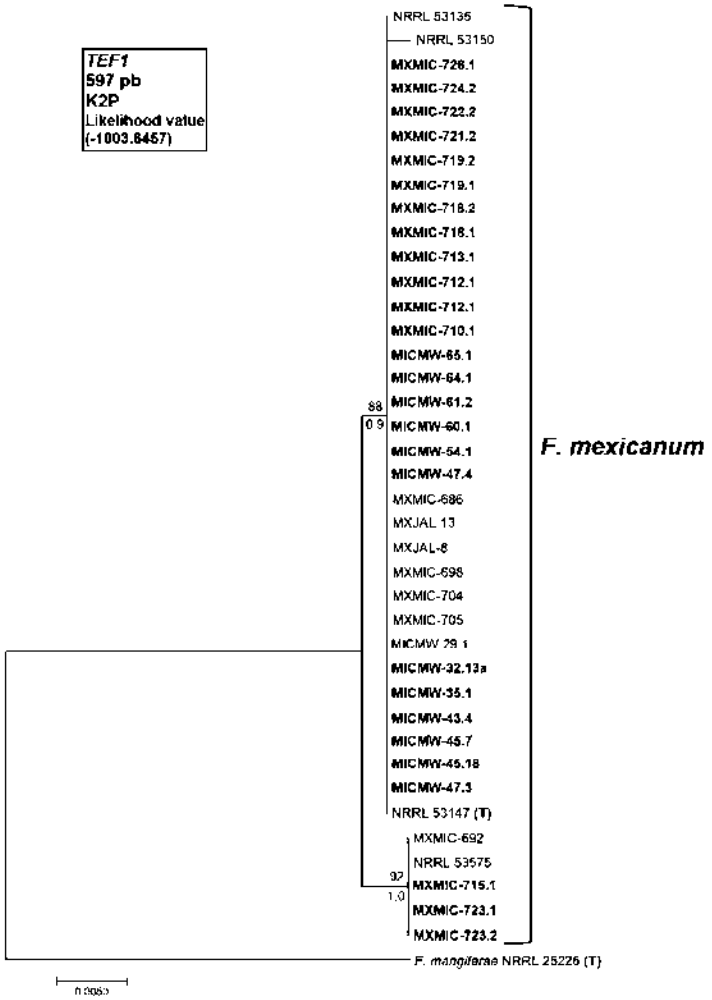


Figura 2. Árbol de Máxima Verosimilitud inferido con el gen *TEF1*. El árbol con el log de verosimilitud más alto es mostrado (-1003.6457). Los valores bootstrap ≥ 70% son mostrados arriba de los internodos (basados en 1000 réplicas) y las probabilidades posteriores >0.7 (basadas en 10,000,000 de generaciones) se indican por debajo de los internodos. El árbol fue enraizado con *Fusarium mangiferae* NRRL 25226. Las secuencias de este estudio se muestran en negritas y con la nomenclatura MICMW (aislados de caoba) y MXMIC (aislados de mango) seguido de su número de colección. K2P=Kimura dos Parametros; (T)=cepa holotipo.

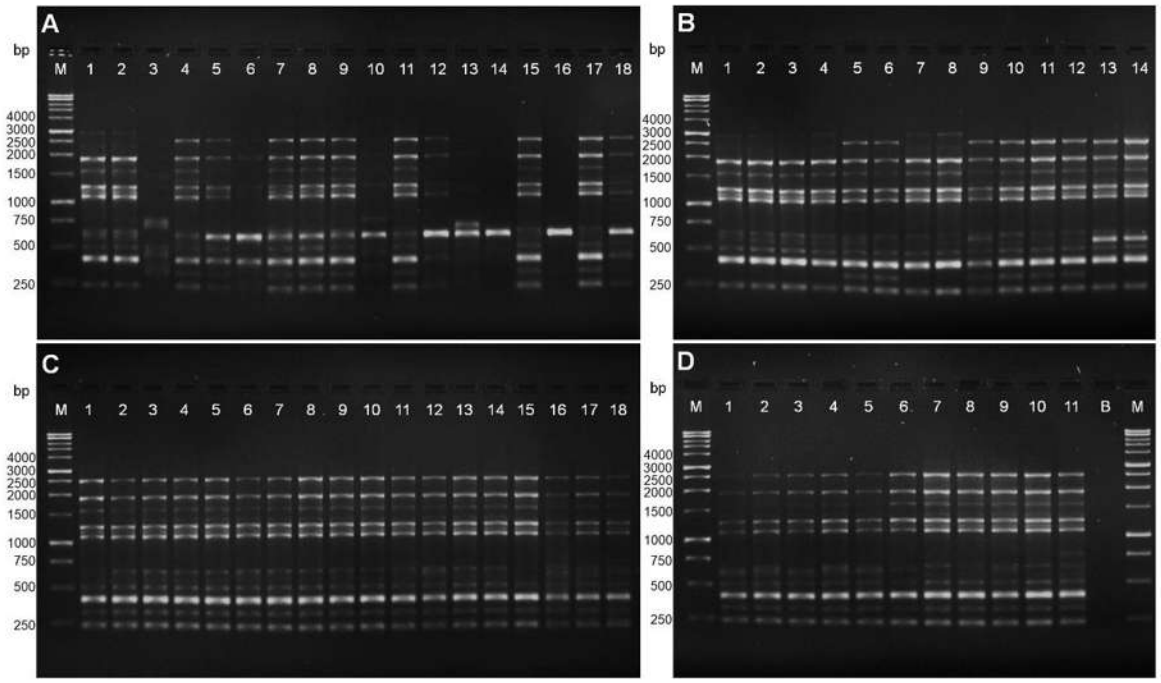


Figura 3. Patrones ISSR obtenidos con el oligonucleótido 891 para las cepas de *F. mexicanum* aisladas de árboles de mango y de caoba de hoja grande con malformación. **A,** aislados MXMIC-717.1 a MXMIC-726.1 obtenidos de malformación de mango en Gabriel Zamora, Michoacán. **B,** aislados MXMIC-710.1 a 716.2 obtenidos de malformación de mango en Nuevo Urecho, Michoacán (carriles 1 a 8) y en La Huacana, Michoacán (carrieles 9 a 14). **C,** aislados MICMW-29.1 a MICMW-45.18 obtenidos de malformación de caoba en Gabriel Zamora, Michoacán. **D,** aislados MICMW-47.3 a MICMW-65.2 obtenidos de malformación de caoba en Nuevo Urecho, Michoacán (carriles 1 a 5) y en La Huacana, Michoacán (carrieles 6 a 11), carril B=control negativo. En todos los casos, electroforesis en gel de agarosa al 2%, carriles M=marcador de pesos moleculares 1 Kb.

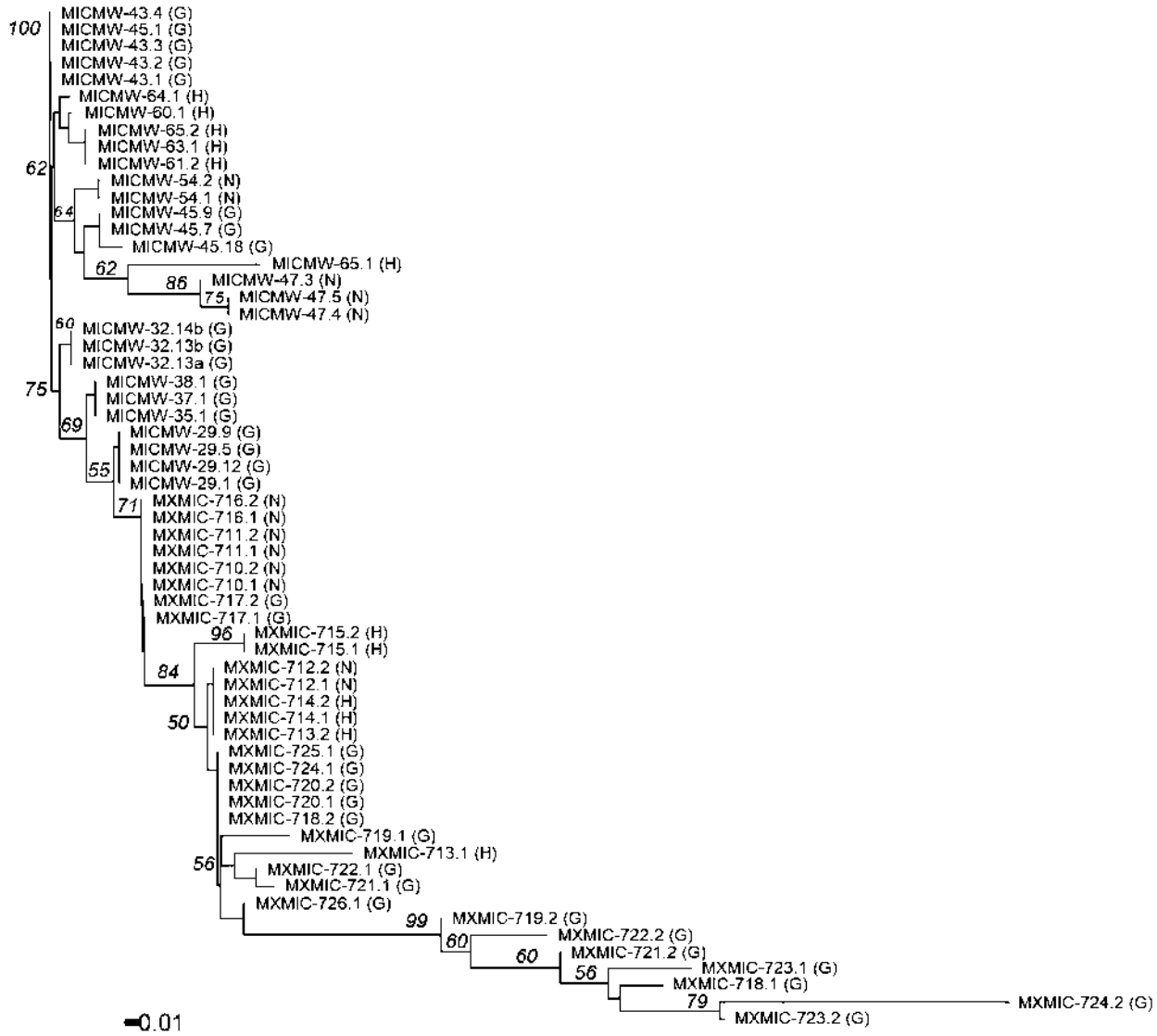


Figura 4. Dendograma Neighbor-Joining basado en el coeficiente de similitud de Nei para los 61 aislados de *F. mexicanum* obtenidos de malformación de mango y caoba de hoja grande. La nomenclatura MICMW corresponde a los aislados de caoba y la nomenclatura MXMIC a los aislados de mango. (G)=Gabriel Zamora; (H)=La Huacana; (N)=Nuevo Urecho.

Conclusiones generales

1. Se identificaron cinco filoespecies de *Fusarium* asociados a malformación de caoba, los cuales fueron *F. mexicanum, F. pseudocircinatum*, FIESC 20-d, FIESC 37-a y FSSC 25-m.

2. *Fusarium mexicanum* y *F. pseudocircinatum* son los agentes causales de la malformación en caoba.

3. La diversidad genética de *F. mexicanum* dentro de las poblaciones fue significativamente mayor, seguido por la variación entre mango y caoba, mientras que entre las regiones geográficas la variación fue menor. En general, se encontró que la diversidad genética fue baja. Sin embargo, fue excepcionalmente alta en las muestras obtenidas de mango de Gabriel Zamora.

4. La diversidad genética observada en los aislados obtenidos de mango en Gabriel Zamora, es dada por la posible recombinación sexual de *F. mexicanum,* debido a que se presentaron ambos tipos de compatibilidad sexual (*MAT1-1* y *MAT1-2*).

Literatura complementaria

Akbari M., Salehi H., and Niazi A. 2018. Evaluation of diversity based on morphological variabilities and ISSR molecular markers in Iranian *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Accessions to select and introduce cold-tolerant genotypes. Mol Biotechnol. 60:259–270.

Aoki T., O´Donnell K., and Geiser D. M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. J Gen Plant Path. 80:189–201.

Betancourt-Resendes I., Gonzaga-Espíritu J. F., Fernández-Pavía S. P., y Rodríguez-Alvarado G. 2010. Compatibilidad vegetativa de aislamientos de *Fusarium sp.* obtenidos de árboles de mango (*Mangifera indica* L.) con malformación en Michoacán. Biológicas. 12:135–142.

Betancourt-Resendes I., Velázquez-Monreal J. J., Montero-Castro J. C., Fernández-Pavía S. P., Lozoya-Saldaña H., and Rodríguez-Alvarado G. 2012. *Fusarium mexicanum* causal agent of mango malformation in Jalisco, Mexico. Rev Mex Fitopatol. 30:115–127.

Britz H., Steenkamp E. T., Coutinho T. A., Wingfield B. D., Marasas W. F. O., and Wingfield M. J. 2002. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. Mycologia. 94:722–730.

CONAFOR. 2017. Plantaciones Forestales Comerciales. Available online at: http://www.conafor.gob.mx/web/temas-forestales/plantaciones-forestales/

Crespo M., Arrebola E., Cazorla F. M., Maymon M., Freeman S., Aoki T., O´Donnell K., Torés J. A. and de Vicente A. 2016. Analysis of genetic diversity of

Fusarium tupiense, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. Plant Dis. 100:276–286.

FAOSTAT (2017) http://www.fao.org/faostat/en/ Accessed Sept 2017.

Freeman S., Maimon M., and Pinkas Y. 1999. Use of GUS transformants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease. Phytopathology. 89:456–461.

Freeman S., Shtienberg D., Maymon M., Levin A. G., and Ploetz R. C. 2014a. New insights into mango malformation disease epidemiology lead to a new integrated management strategy for subtropical environments. Plant Dis. 98:1456–1466.

Freeman S., Otero-Colina G., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S., Maymon M., Ploetz R. C., Aoki T., and O'Donnell K. 2014b. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. Plant Dis. 98:1583.

García-López E., Mora-Aguilera J. A., Nava-Díaz C., Villegas-Monter A., Tovar-Pedraza J. M., Serra C. and Batista-Marte C. M., 2016. First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. Plant Dis. 100:1501.

Geiser D. M., Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., and O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur J Plant Pathol. 110:473–479.

Gerlach W., and Nirenberg H. I. 1982. The genus *Fusarium*-a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst Land Forstwirtsch Berlin Dahlem. 209:1–406.

Ibrahim A. N., Satour M. M., El-Tobshy Z. M., and Abdel-Sattar M. A. 1975. Pathological and histological note on mango malformation in Egypt. Curr Sci. 44:443–444.

Kim Y., Hutmacher R. B., and Davis R. M. 2005. Characterization of California isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Plant Dis. 89:366–372.

Kvas M., Marasas W. F. O., Wingfield B. D., Wingfield M. J., and Steenkamp E. T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Diver. 34:1–21.

Laurence M. H., Walsh J. L., Shuttleworth L. A., Robinson D. M., Johansen R. M., Petrovic T., Vu T. T. H., Burgess L. W., Summerell B. A., and Liew E. C. Y. 2015. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. Fungal Diver. 77:349–366.

Lemes M. R., Gribel R., Proctor J., and Grattapaglia D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. Mol Ecol. 12:2875–2883.

Leslie J. F., and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA.

Lima C. S., Monteir J. H. A., Crespo N. C., Costa S. S., Leslie J. F. and Pfenning L. P. 2009. GCV and AFLP analyses identify the same groups in the casual agents of mango malformation in Brazil. Eur J Plant Path. 123:17–26.

Lima C. S., Pfenning L. H., Costa S. S., Abreu L. M., and Leslie J. F. 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. Mycologia. 104:1408–1419.

Liu F., Weia J., Zhan R., Oub X., Chang J. 2014. Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango. Sci Hortic. 165:352–356.

Manicom B. Q. 1989. Blossom malformation of mango. South African Mango Grower's Association Yearbook. 10:11–12.

Marasas W. F. O., Ploetz R. C., Wingfield M. J., Wingfield B. D., and Steenkamp E. T. 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. Phytopathology. 96:667–672.

Milgroom M. G, and Peever T. L. 2003. Population biology of plant pathogens. The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. Plant Dis. 87:608–617.

Moussa T. A. A., Al-Zahrani H. S., Kadasa N. M. S., Ahmed S. A., de Hoog G. S., and Al-Hatmi A. M. S. 2017. Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. Antonie Van Leeuwenhoek, 110:819–832.

Noriega C. D. H. 1996. “Escoba de bruja” del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado. Tesis Doctoral. Colegio de Posgraduados. Montecillo, México. 72 pp.

O'Donnell K., Cigelnik E., and Nirenberg H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. 90:465–493.

Otero-Colina G., Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S., Maymon M., Ploetz R. C., Aoki T. A., O'Donnell K., and Freeman S. 2010. Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. Phytopathology. 100:1176–1184.

Ploetz R. C., and Gregory N. 1993. Mango malformation in Florida: Distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships within and among strains from different orchards. Acta Hortic. 341:388–394.

Ploetz R. C. 2001. Malformation: A unique and important disease of mango, *Mangifera indica* L. Pages 233–247 in: *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse and W. L. Bryden, eds. APS Press, St Paul, MN.

Ploetz R. C., and Freeman S. 2009. Foliar, Floral and Soilborne Diseases. Pages 231–301. in: The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. R. E. Litz, ed. CAB International, Homestead, FL.

Prieto M. J. J., Covarrubias A. J. E., Romero C. A., y Figueroa V. M. O. 2005. Paquetes tecnológicos para el cultivo del mango en el estado de Colima. http://www.campocolima.gob.mx/.../planrector/PlanRectorMango.pdf.

Raj R. S., Thakur S. V., Vyas Y. S., Patel K. M., Patel P. V., Joshi M. N., Tiagi S. N. and Bagatharia S. B. 2017. Diversity analysis, pathogen load and gene expression studies of mango cultivars infected by mango malformation disease. Plant Growth Regul. 81:117–130.

Rodríguez-Alvarado G., Fernández-Pavía S. P., Ploetz R. C., and Valenzuela-Vázquez M. 2008. A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum*

and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, Mexico. Plant Pathol. 57:181.

Senghor A. L., Sharma K., Kumar P. L., and Bandyopadhyay R. 2012. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium tupiense* in Senegal. Plant Dis. 96:1582.

Skovgaard K., Nirenberg H. I., O'Donnell K., and Rosendahl S. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. Phytopathology. 91:1231–1237.

Soto-Plancarte A. 2013. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* causantes de la malformación del mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Soto-Plancarte A., Santillán-Mendoza R. Fernández-Pavía S. P., Ploetz R. C., Freeman S., Ortega-Arreola R., Osuna-Ávila P., Velázquez-Monreal J. J. and Rodríguez-Alvarado G. 2015. Mango nurseries as sources of *Fusarium mexicanum,* cause mango malformation disease in central western Mexico. Phytoparasitica. 43:427–435.

Summanwar A. S, Raychaudhuri S. P., and Pathak S. C. 1966. Association of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. with the malformation in mango (*Mangifera indica* L.). Indian Phypathol. 19:227–228.

Summerell B. A., Laurence M. H., Liew E. C. Y., and Leslie J. F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. Fungal Divers. 44:3-13.

Summerell B. A., and Leslie J. F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? Fungal Divers. 50:135–144.

Varma A., Lele V. C., Raychauduri S. P., Ram A., and Sang A. 1974 Mango malformation: A fungal disease. J Phytopathol. 79:254–257.

Verissimo A. C., Barreto P., Tarifa R., and Uhl C. 1995. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. For Ecol Manag. 72:39–60.

Vitale S., Santori A., Wajnber E., Castagnone-Sereno P., Luongo L., and Belisario A. 2011. Morphological and molecular analysis of *Fusarium lateritium*, the cause of gray necrosis of hazelnut fruit in Italy. Mycology. 101:679–686.

Zhan R. L., Yang S. J., Ho H. H., Liu F., Zhao Y. L., Chang J. M., and He Y. B. 2010. Mango malformation disease in south China caused by *Fusarium proliferatum*. J Phytopathol. 158:721–725.

ANEXO I

Protocolos I. Microbiología

Preparación de medios de cultivo

Medio líquido papa dextrosa

1. Se preparó el volumen mínimo necesario de medio de cultivo dependiendo del propósito del experimento.
2. Se seleccionaron papas frescas (sin manchas verdes), se lavaron y se cortaron en rodajas delgadas de 0.5 cm de diámetro.
3. Se pesó la cantidad de papa necesaria de acuerdo al volumen de medio que se preparó (Cuadro 1).
4. Se agregó un volumen de agua destilada igual al volumen total que se preparó, se pusieron a hervir a fuego lento hasta que estuvieron blandas sin que se sobrecosieran.
5. El caldo de papa se filtró con dos capas de manta cielo colocada en un embudo sobre una probeta.
6. Se aforó al volumen deseado y se vació a un vaso de precipitado.
7. La dextrosa (glucosa) se adicionó, se agitó en un agitador magnético para disolverla.
8. Se transfirieron 700 µl de medio a microtubos de 1.5 ml, los cuales se cerraron bien.
9. Los microtubos con medio se colocaron en una gradilla y todo se envolvió con papel aluminio.
10. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

11. La gradilla con los tubos se transfirió de la autoclave a la campana de flujo laminar, se dejó enfriar, se revisó que todos los tubos estuvieran cerrados.

12. Los tubos con medio se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Cuadro 1. Ingredientes para preparar medio líquido papa dextrosa

Ingrediente	Volumen total de medio de cultivo		
	100 ml	**250 ml**	**1000 ml**
Papa fresca	25 g	62.5 g	250 g
Dextrosa	2 g	5 g	20 g

Medio agar papa dextrosa deshidratado (PDA) con PCNB y antibióticos

1. Generalmente este medio se preparó en volúmenes de 250 ml, se pesaron 9.75 g de PDA deshidratado (Bioxon), se vació en un frasco con tapadera de rosca y se adicionó 250 ml de agua destilada (Cuadro 2).

2. El medio se disolvió calentando en un horno de microondas.

3. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.

4. Se transfirió de la autoclave a un baño de agua a 49°C por aproximadamente 30 min para estabilizar su temperatura.

5. La campana de flujo laminar se asperjó con alcohol 70%, se encendió el motor, sobre la cual se colocó el material que se usó: cajas de Petri en donde se vació el medio de cultivo, un micropipeta de 1000 µl, una caja con puntas estériles para la micropipeta y tubos con PCNB y Formizina descongelados. Todo el material que se introdujo a la campana se asperjó previamente con alcohol 70%.

6. El frasco con el medio de cultivo se transfirió del baño de agua a 49ºC a la campana de flujo laminar. Inmediatamente se agregaron al medio el PCNB y la Formizina (Cuadro 2).
7. El fungicida y antibiótico se mezclaron con el medio sin hacer burbujas.
8. El medio se vació en cajas Petri de 100x15 mm o 60x15 mm.
9. Después de que el medio gelificó, las cajas de Petri con el medio se colocaron en bolsas de plástico, se envolvió en papel aluminio y se almacenó a 4°C.

Cuadro 2. Ingredientes para preparar medio agar papa dextrosa

Ingrediente	Volumen total de medio de cultivo	
	250 ml	1,000 ml
PDA	9.75 g	39 g
PCNB[a]	185 µl	740 µl
Formizina[b]	250 µl	1 ml

[a]Penta Cloro Nitro Benceno, fungicida.

[b] Formizina se consigue en farmacias veterinarias. El producto está en polvo y contiene Penicilina 5,000,000 de unidades/20 ml y estreptomicina 6.25 g/20 ml.

Medio agar peptona PCNB (PPA o medio Nash-Snyder) y antibióticos

1. Usualmente se prepararon volúmenes de 250 ml de medio.
2. En un vaso de precipitado de 400 ml se adicionaron 230 ml de agua destilada. El vaso se colocó en un agitador magnético.
3. Se agregaron los ingredientes KH_2PO_4 y $MgSO_4.7H_2O$ de acuerdo al orden establecido en el Cuadro 3, y se disolvieron.
4. La solución se aforó a 250 ml en una probeta.

5. Se vació en un frasco con tapadera de rosca, y se adicionó la peptona y el agar bacteriológico.
6. Los ingredientes se disolvieron calentando el medio en un horno de microondas.
7. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.
8. El medio se estabilizó en el baño de agua a 49°C por 30 min.
9. La campana de flujo laminar y materiales se prepararon como se indicó en el protocolo anterior.
10. El frasco con el medio de cultivo se transfirió del baño de agua a 49ºC a la campana de flujo laminar. Inmediatamente se agregaron el PCNB y la Formizina.
11. El fungicida y antibiótico se mezclaron con el medio sin hacer burbujas.
12. El medio se vació en cajas Petri de 100x15 mm o 60x15 mm.
13. Después de que el medio gelificó, las cajas de Petri con el medio se colocaron en bolsas de plástico, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a 4°C.

Cuadro 3. Ingredientes para preparar medio agar peptona PCNB

Orden para agregar	Ingrediente	Volumen total de medio de cultivo	
		250 ml	**1,000 ml**
1	KH_2PO_4	0.25 g	1 g
2	$MgSO_4.7H_2O$	0.125 g	0.5 g
3	Peptona de caseína Bioxon	3.75 g	15 g
4	Agar bacteriológico Bioxon	5 g	20 g
5	PCNB[a]	185 µl	740 µl
6	Formizina[b]	250 µl	1 ml

[a]Penta Cloro Nitro Benceno, fungicida.

[b]Penicilina 5,000,000 de unidades/20 ml y estreptomicina 6.25 g/20 ml.

Medio SNA (medio sintético bajo en nutrientes, Nirenberg y O'Donnell, 1998)

1. Usualmente se prepararon volúmenes de 250 ml de medio.
2. En un vaso de precipitado de 400 ml se adicionaron 230 ml de agua destilada. El vaso se colocó en un agitador magnético.
3. Se agregaron y disolvieron los ingredientes de acuerdo al Cuadro 4, con la excepción del agar.
4. Se aforó a 250 ml en una probeta.
5. Se vació en un frasco con tapadera de rosca y se adicionó el agar bacteriológico.
6. Los ingredientes se disolvieron calentando el medio en un horno de microondas.

7. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.
8. Se estabilizó en el baño de agua a 49°C por 30 min.
9. La campana de flujo laminar y materiales se prepararon como se indicó en el protocolo anterior.
10. El frasco con el medio de cultivo se transfirió del baño de agua a 49ºC a la campana de flujo laminar.
11. Se vació en cajas Petri 60x15 mm.
12. Después de que el medio gelificó se colocaron de dos a cuatro cuadritos (5 x 5 mm) de papel filtro Whatman No. 1 estéril en cada caja.
13. Las cajas de Petri con el medio se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 26°C hasta su uso.

Cuadro 4. Ingredientes para preparar medio SNA

Orden para agregar	Ingredientes	Volumen total de medio de cultivo	
		250 ml	1000 ml
1	KH_2PO_4	0.25 g	1 g
2	KNO_3	0.25 g	1 g
3	Kcl	0.125 g	0.5 g
4	$MgSO_4.7H_2O$	0.125 g	0.5 g
5	Glucosa	0.05 g	0.2 g
6	Sacarosa	0.05 g	0.2 g
7	Agar bacteriológico Bioxon	5 g	20 g

Medio agar agua 2%

1. Generalmente este medio se preparó en volúmenes de 250 ml.
2. Se pesaron 5 g de agar bacteriológico (Bioxon), se vació en un frasco con tapadera de rosca y se adicionó 250 ml de agua destilada.
3. El medio se disolvió calentando en un horno de microondas.
4. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.
5. Se transfirió de la autoclave a un baño de agua a 49°C por aproximadamente 30 min para estabilizar su temperatura.
6. Se vació en cajas Petri 100x15 mm.
7. Las cajas Petri con el medio se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 26°C hasta su uso.

Medio agar hojas de clavel 2% (CLA, Fisher et al., 1982)

1. Generalmente este medio se preparó en volúmenes de 250 ml.
2. Se pesaron 5 g de agar bacteriológico (Bioxon), se vació en un frasco con tapadera de rosca y se adicionaron 250 ml de agua destilada.
3. El medio se disolvió calentando en un horno de microondas.
4. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min.
5. Se transfirió de la autoclave a un baño de agua a 49°C por aproximadamente 30 min para estabilizar su temperatura.
6. Se colocaron en cada caja Petri de cuatro a seis cuadritos (5x5 mm) de hojas de clavel esterilizadas por rayos gamma.

7. El medio se vació en cajas Petri 100x15 mm sobre los trozos de hojas de clavel.
8. Las cajas Petri con el medio se colocaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 26°C hasta su uso.

Colecta, aislamiento, purificación y patogenicidad de *Fusarium*

Colecta de tejido vegetal de caoba con síntomas de malformación

El follaje de los árboles de caoba de hoja grande se dividió en 4 zonas (norte, sur, este y oeste) en la parte media del árbol. De cada zona del árbol se colectó una muestra de tejido vegetal sintomático de brotes jóvenes, de un tamaño aproximado de 20 cm. Se removieron las hojas no malformadas de la muestra. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas, se transportaron al laboratorio en una hielera y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

Aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido vegetal (directo)

1. Se colocó el tejido vegetal en tubos cónicos de 50 ml etiquetados (los tubos no necesitan estar estériles.
2. Se preparó una solución jabonosa mezclando 0.1% de jabón Roma® en agua destilada.
3. Se adicionó a cada tubo 20 ml de la solución jabonosa.
4. Los tubos se agitaron gentilmente por 10 min. Esto removió del tejido vegetal insectos y polvo.
5. La solución jabonosa se drenó.

6. Se agregó agua destilada estéril para remover el jabón de las muestras de tejido.
7. Se drenó el agua del enjuague.
8. Se adicionó una solución de cloro al 5% a los tubos con las muestras.
9. Los tubos se agitaron vigorosamente por 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril.
10. El tejido vegetal se secó con toallas de papel estéril utilizando pinzas estériles.
11. El tejido se cortó en pequeños explantes de 3-5 mm.
12. Se colocaron 5 a 6 explantes por cada caja de Petri con medio PDA suplementado con PCNB y antibióticos, o en caja Petri con medio PPA suplementado con PCNB y antibióticos.
13. Las cajas con los explantes se incubaron a 25°C bajo luz blanca brillante y negra continúa, por 24 a 48 h.

Aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido vegetal (diluciones)

1. Se colocó el tejido vegetal en tubos cónicos de 50 ml etiquetados (los tubos no necesitan estar estériles).
2. Se preparó una solución jabonosa mezclando 0.1% de jabón Roma® en agua destilada.
3. Se adicionó a cada tubo 20 ml de la solución jabonosa.
4. Los tubos se agitaron gentilmente por 10 min. Esto removió del tejido vegetal insectos y polvo.

5. La solución jabonosa se drenó.
6. Se agregó agua destilada estéril para remover el jabón de las muestras de tejido.
7. Se drenó el agua del enjuague.
8. Se adicionó una solución de cloro al 5% a los tubos con las muestras.
9. Los tubos se agitaron vigorosamente por 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril.
10. El tejido vegetal se secó con toallas de papel estéril utilizando pinzas estériles.
11. El tejido se cortó en pequeños explantes de 3-5 mm.
12. Se colocaron 20-25 explantes en un mortero estéril y se adicionó 10 ml de agua destilada estéril. Los tejidos se molieron hasta obtener una suspensión.
13. Se inocularon alícuotas de 25 o 50 µl en cajas Petri con PDA suplementado con PCNB y antibióticos, o en cajas Petri con PPA suplementado con PCNB y antibióticos.
14. Las cajas se incubaron a 25°C bajo luz blanca brillante y negra continúa, por 24 a 48 h.

Purificación de aislados de *Fusarium* por punta de hifa

1. Las colonias fúngicas emergidas del tejido vegetal que presentaron crecimiento típico de *Fusarium* se transfirieron a cajas Petri con agar agua al 2%.

2. Los cultivos se incubaron a 25°C bajo luz blanca brillante y negra continúa, por 48 h.
3. Se utilizó un microscopio estereoscópico para ubicar hifas que estaban alejadas de la colonia.
4. Con un bisturí se cortó la punta de una hifa seleccionada y se transfirió a una caja Petri con SNA.
5. De cada muestra se transfirió un máximo de 20 colonias.
6. Los cultivos se incubaron a 25°C bajo luz blanca brillante y negra continúa, por 7 a 10 días.

Caracterización cultural de *Fusarium*

Los aislados de *Fusarium* se inocularon en cajas Petri 100x15 mm con PDA y se incubaron en oscuridad a 25°C por 14 días, para determinar el color, tipo de micelio y pigmentos producidos en el medio de cultivo.

Caracterización morfológica de *Fusarium*

Los aislados de *Fusarium* se inocularon en cajas Petri 100x15 mm con SNA y CLA y se incubaron a 25°C bajo luz blanca y negra por 14 días. Se hicieron observaciones de las estructuras reproductivas y del micelio, tales como, tipos de fiálide, ancho, longitud y número de septos de los macro y microconidios, presencia de hifas enrolladas estériles y de clamidosporas, utilizando un microscopio compuesto.

Preparación del inóculo para pruebas de patogenicidad

1. Los aislados seleccionados para realizar las pruebas de patogenicidad se inocularon en seis cajas Petri 100x15mm con SNA utilizando alícuotas de 50 µl de una suspensión de conidios.
2. Los cultivos se incubaron a 25°C bajo luz blanca brillante y negra continua, por diez días.
3. En campana de flujo laminar se adicionaron 12 ml de agua destilada estéril a una de las seis cajas con cultivos de cada aislado.
4. Los conidios se desprendieron utilizando una varilla de vidrio estéril.
5. La suspensión de conidios se transfirió de la primera caja a la segunda. Se repitió el procedimiento para desprender los conidios de las cajas restantes.
6. La suspensión de conidios se transfirió a un tubo cónico de 50 ml.
7. Se hicieron diluciones 1:100 de la suspensión de conidios en microtubos de 500 µl.
8. Se realizaron conteos de conidios en una cámara de Neubauer.
9. Se ajustó la concentración de conidios a 4×10^6 células por ml en un volumen de 50 ml.

Germinación e inoculación de plántulas de caoba de hoja grande

1. Se removió la testa de las semillas de caoba.
2. Las semillas se colocaron en agua destilada estéril por 6 h.
3. Las semillas se transfirieron a un recipiente de plástico con toallas de papel humedecidas con agua destilada estéril (cámara húmeda).

4. Catorce días después de la germinación de las semillas, las plántulas se inocularon por inmersión en una suspensión de conidios (4 x 10^6 cels/ml).
5. Se utilizaron diez plántulas por aislado de *Fusarium*.
6. Las plántulas inoculadas se mantuvieron en la suspensión de conidios por a 25°C por 12 y 18 h.
7. Las plántulas inoculadas se transfirieron a macetas de 300 ml conteniendo una mezcla estéril de peat moss:perlita (proporción 1:1).
8. Las plántulas se mantuvieron en el laboratorio a 25°C con fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, por 7 días.
9. Las plantas se transfirieron al invernadero. Se regaron con una mezcla de agua destilada y agua de la llave (1:1). No se fertilizaron.
10. Se realizaron observaciones cada 20 días hasta la aparición de síntomas.

Reaislamiento de los aislados de *Fusarium* inoculados en las pruebas de patogenicidad

Los reaislamientos se realizaron como se describió en el apartado de aislamiento de *Fusarium* a partir de tejido malformado. La identificación de los aislados obtenidos se hizo mediante análisis de Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR), con base en los patrones de bandeo obtenidos con tres oligonucleótidos para la cepas inoculadas y mediante la amplificación del gen *TEF1*.

ANEXO II

Protocolos II. Biología Molecular

Extracción de ADN genómico de *Fusarium*

1. Microtubos con las cepas de *Fusarium* se removieron de la colección de hongos a 12ºC, se tomó una alícuota de 50 µl suspensión de esporas y se transfirió a un microtubo que contenía 700 µl de medio caldo papa dextrosa. Los cultivos se incubaron a 25°C por 7 a 10 días.

2. El micelio que se generó de cada cepa cultivada se lavó dos veces con agua destilada estéril. El microtubo con el micelio se colocó en una incubadora a 35 – 37ºC por toda la noche para deshidratar la mata micelial.

3. El micelio seco se almacenó a -20ºC o se molió con Nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El micelio molido se almacenó a -20ºC o se procesó el mismo día.

4. Para iniciar el proceso de extracción del ADN genómico de cada cepa, se adicionaron a cada microtubo con micelio molido, 500 µl de Buffer de Lisis y 10 µl de SDS 1% (Cuadro 1).

5. Se agitó por 10 seg en vortex a máxima velocidad.

6. Se adicionaron 10 µl de 2-mercaptoetanol, se mezcló por inversión.

7. Se incubó a 65°C por 60 min. Se mezcló por inversión cada 10 min.

8. Los microtubos e colocaron en una gradilla sobre la mesa por 15 min para que se enfriaran.

9. Se adicionaron 500 µl de una mezcla fría (4°C) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

10. Se agitó en vortex por 10 seg. Se centrifugó a 10,000 rpm por 8 min.

11. El sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril nuevo etiquetado. Se utilizó una punta nueva para cada microtubo.

12. Se adicionaron 5 µl de ARNasa A [20 mg/ml] e incubó a 37°C por 15 min.

13. Se adicionaron 400 µl de una mezcla fría (4°C) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

14. Se agitó en vortex por 10 seg. Se Centrifugó a 10,000 rpm por 8 min.

15. El sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril nuevo etiquetado. Se utilizó una punta nueva para cada tubo.

16. Se adicionaron 700 µl de isopropanol frío (-20°C). Se mezcló suavemente.

17. Se incubó a -20°C toda la noche.

18. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante.

19. Se agregaron 600 µl de EtOH 70% frío (-20°C). Se agitó manualmente por 5 min.

20. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.

21. El paso anterior se repitió adicionando 600 µl de EtOH absoluto frío (-20°C).

22. Los tubos se dejaron abiertos después de drenar el alcohol para que las pastillas se secaran a temperatura ambiente por 15 min.

23. La pastilla de ADN se resuspendió en agua grado Biología Molecular o en Buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), precalentados a 65°C. Se agregó 50 a 100 µl por muestra.

24. Las muestras de ADN se almacenaron a -20° C.

Cuadro 1. Buffer de Lisis pH 8.0 para la extracción de ADN

Orden para mezclar	Reactivo	Concentración	Cantidad para 200 ml
1	CTAB	2% (p/v)	4 g
2	NaCl	1.4 M	16.36 g
3	Trizma Base	100 mM	2.422 g
4	EDTA Na_2	20 mM	1.48 g

Modo de preparación del Buffer de Lisis para la extracción de ADN

1. Se vaciaron 175 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 ml.
2. El vaso de precipitado se colocó en un agitador magnético y se adicionaron los reactivos en el orden indicado en el Cuadro 1.
3. El CTAB (Bromuro de hexadecil trimetilamonio) se disolvió con facilidad cuando el agua destilada se calentó entre 60 – 70°C y en agitación. Después de que el CTAB se disolvió se agregaron los demás compuestos.
4. Una vez que todos los reactivos estaban disueltos, el pH se ajustó a 8.0 adicionando HCl.
5. Se aforó en una probeta a 200 ml con agua destilada.
6. Se vació en un frasco de 500 ml etiquetado y se esterilizó a 121°C por 20 min.

Cuantificación de la concentración de ADN genómico utilizando un aparato Varioskan Flash (Thermo Scientific)

1. El aparato Varioskan Flash y la computadora se encendieron.
2. Se inició el programa Skant software 2.5
3. Se seleccionó la opción del programa para cuantificar ADN/ARN.

4. Se limpió la placa del Varioskan Flash con alcohol al 70%, se secó completamente.

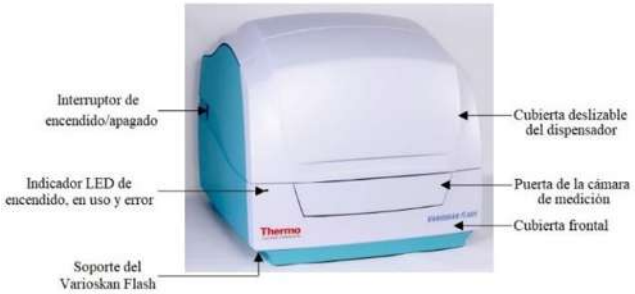
5. Se colocó una gota de 2 µl en cada uno de los 16 pozos de la placa.

6. Se abrió la puerta de la cámara de medición, se colocó la placa, se cerró la puerta.

7. Se inició la cuantificación de las concentraciones.

8. Posteriormente, se hicieron diluciones del ADN a 12 ng/ µl para las reacciones de PCR.

9. No fue necesario realizar una medición de agua (control o blanco).



Placa de medición para 16 muestras del Varioskan Flash

Reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares

Los reactivos que se utilizaron en las reacciones se agregaron en microtubos especiales para PCR de 200 µl. Inicialmente, se preparó una mezcla que contenía los reactivos indicados en el Cuadro 2, sin el ADN, en un microtubo de 500 µl. El volumen total de la mezcla y de los reactivos agregados dependió del número de muestras de ADN que se procesaron (ver Cuadro 2).

1. Se hicieron los cálculos necesarios para el total de muestras más el blanco (sin ADN).
2. Los microtubos para PCR se etiquetaron con los códigos correspondientes.
3. Los reactivos se removieron del congelador, se descongelaron, se colocaron en hielo, se centrifugaron por 7 seg.
4. La mezcla se preparó en un microtubo de 500 µl, agregando inicialmente el agua grado Biología Molecular, los oligonucleótidos y finalmente el master mix (GoTaq Hot Start Colorless Master Mix, Promega).
5. Se transfirieron 10 µl de la mezcla a cada uno de los microtubos utilizando la misma punta porque los tubos están estériles.
6. Se adicionaron 3 µl de ADN (12 ng/µl) a cada microtubo utilizando una punta por muestra.
7. Los reactivos se mezclaron y se centrifugaron por 7 seg. Los microtubos se colocaron en el termociclador.
8. Se seleccionó el programa requerido y se iniciaron los ciclos de PCR.

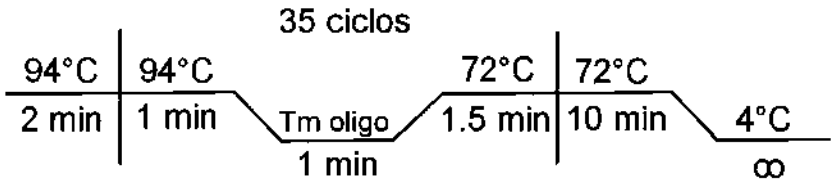
Cuadro 2. Reactivos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares

Reactivo	Cantidad 1X	Cantidad para 10X
Master Mix (Promega)	6.25 µl	62.5 µl
Oligonucleótido Fw	0.0675 µl	0.675 µl
Oligonucleótido Rev	0.0675 µl	0.675 µl
Agua grado Biología Molecular	3.62 µl	36.2 µl
ADN (12 ng/µl)	3 µl	3 µl/muestra

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar regiones parciales de genes nucleares.

Gen	Oligonucleótido	Tm °C	Temperatura de hibridación	Secuencia	Referencia
TEF1	EF-1	57	55°C	5´ATGGGTAAGGARGACAAGAC´3	O´Donnell et al., 1998. PNAS 95:2044-2049.
	EF-2	55		5´GGARGTACCAGTSATCATGTT´3	
β-tubulin	T1	58	55°C	5´AACATGCGTGAGATTGTAAGT´3	O´Donnell et al., 1997. Mol Phylogen Evol. 7:103-116.
	T22	65		5´TCTGGATGTTGTTGGGAATCC´3	
RPB2 5´	5F2	63	55°C	5´GGGGWGAYCAGAAGAAGGC´3	O´Donnell et al., 2007. J Clin Microbiol. 45:2235-2248.
	7cR	60		5´CCCATRGCTTGYTTRCCCAT´3	
RPB2 3´	7cF	52	52°C	5´ATGGGYAARCAAGCYATGGG´3	Liu et al., 1999. Mol Biol Evol. 16:1799-1808.
	11aR	70		5´GCRTGGATCTTRTCRTCSACC´3	

Figura 1. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar regiones parciales de genes nucleares.



Reacciones de PCR para amplificar Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR)

El protocolo para hacer las reacciones de PCR es similar al descrito en el apartado anterior para amplificar genes nucleares, con modificaciones en el número de oligonucleótidos utilizados en cada reacción y el volumen de agua.

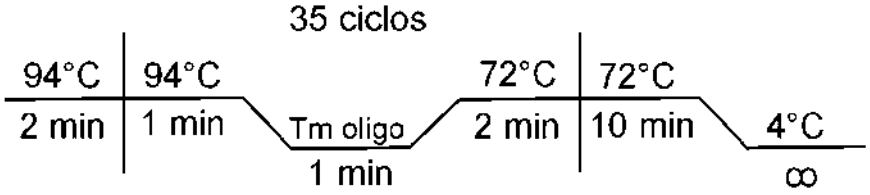
Cuadro 4. Reactivos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR)

Reactivo	Cantidad 1X	Cantidad para 10X
Master Mix Promega	6.25 µl	62.5 µl
Oligonucleótido	0.0675 µl	0.675 µl
H_2O (grado BM)	3.6875 µl	36.875 µl
ADN (12 ng/µl)	3 µl	3 µl/muestra

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR).

Oligonucleótido	Tm °C	Secuencia	Referencia
ISSR-808	52	5´AGAGAGAGAGAGAGAGC´3	Liu et al., 2014. Scientia Horticulturae. 165:352–356.
ISSR-809	52	5´AGAGAGAGAGAGAGAGG´3	
ISSR-812	50	5´GAGAGAGAGAGAGAGAA´3	
ISSR-835	55	5´AGAGAGAGAGAGAGAGYC´3	
ISSR-891	50	5´HVHTGTGTGTGTGTGTG´3	

Figura 2. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados en las reacciones de PCR para amplificar Secuencias Internas Repetidas Simples (ISSR).



Instrucciones para usar del termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf)

1. Prender el termociclador. El interruptor está en la parte trasera del aparato.
2. En el menú principal, entrar en la segunda opción, “FILES”.
3. Se desplegará un menú, seleccionar la cuarta opción, “New”, aparecerá un recuadro del lado derecho “Edit Unnamed”, comenzar la edición.
4. LID=∗∗∗° cambiar a LID=105°, indica la temperatura a la cual permanecerá la tapadera del termociclador durante el PCR.
5. Bajar con las flechas y presionar el número 1.
6. T=∗∗∗∗° cambiar a T=95°, moverse a la derecha con las flechas ∗∗:∗∗:∗∗ cambiar a 0:02:00. **Primer Paso.**
7. Bajar con las flechas y presionar el número 1.
8. T=∗∗∗∗° cambiar a T=95°, moverse a la derecha con las flechas ∗∗:∗∗:∗∗ cambiar a 0:01:00. **Desnaturalización. Segundo Paso.**
9. Bajar con las flechas y presionar el número 1.
10. T=∗∗∗∗° cambiar a temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, ejemplo T=55°, moverse a la derecha con las flechas ∗∗:∗∗:∗∗ cambiar a 0:01:00. **Alineamiento. Tercer Paso.**
11. Bajar con las flechas y presionar el número 1.
12. T=∗∗∗∗° cambiar a T=72° (temperatura de funcionamiento de la Taq Polimerasa), moverse a la derecha con las flechas ∗∗:∗∗:∗∗ cambiar el tiempo de acuerdo al tamaño de amplificación esperado (1 min/1Kb) 0:01:00. **Extensión. Cuarto Paso.**
13. Bajar con las flechas y presionar el número 4.

14. Aparecerá la leyenda “GOTO ∗∗∗” cambiar por GOTO 2 (lo cual indica ir al segundo paso), al lado derecho de GOTO aparece “REP ∗∗∗” cambiar por el número de ciclos necesarios, ejemplo REP 34 (si se desean 35 ciclos). **Quinto Paso.**

15. Bajar con las flechas y presionar el número 1.

16. T=∗∗∗∗° cambiar a T=72°, moverse a la derecha con las flechas ∗∗:∗∗:∗∗ cambiar el tiempo de extensión final al necesario 0:10:00 (normalmente 10 min). **Sexto Paso.**

17. Bajar con las flechas y presionar el número 2.

18. Aparecerá la leyenda “HOLD ∗∗∗° ENTER” cambiar por HOLD 4.0° ENTER (para mantener a 4°C). **Séptimo Paso.**

19. Finalizar edición, presionar el botón “EXIT”, preguntará si quieres guardarlo seleccionar “YES” con botón “ENTER”.

20. Nombrar el programa, “ProgName:” cambiar letra por letra con el botón “Sel”, una vez nombrado presionar “ENTER”.

21. El programa ha sido creado, regresar al menú principal y presionar el botón “Start/Stop” para comenzar el PCR.

Electroforesis en gel de agarosa

1. Los geles se prepararon en bandejas apropiadas para las cámaras electroforéticas que se usaron. Las bandejas grandes se colocaron en el aparato para ensamblaje, mientras que las bandejas pequeñas se sellaron en los extremos con cinta. Las bandejas se nivelaron para que los geles estuvieran horizontales.

2. Se pesó la cantidad de agarosa de acuerdo a la bandeja que se utilizó, y se vació en un frasco con buffer TAE 1X, en el volumen apropiado (Cuadro 7). No agitar.

3. El gel se preparó con buffer TAE 1X y la electroforesis se realizó con el mismo buffer. Es conveniente preparar buffer TAE como una solución concentrada 50X y a partir de esta, preparar TAE 1X, mezclando 40 ml de TAE 50X con 1,960 ml de agua destilada.

4. La suspensión de agarosa y TAE 1X se calentó en un horno de microondas para disolver la agarosa. Es importante que no queden grumos de agarosa. Calentar nuevamente si es necesario hasta que se disuelvan.

5. La solución de agarosa se enfrío a 40°C aproximadamente, se adicionó bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/ml, se mezcló suavemente para no generar burbujas y se vació en la bandeja. Inmediatamente se colocó el peine correspondiente. Cuando se prepararon geles en la bandeja grande no se agregó bromuro de etidio a la agarosa, ya que el gel se tiño al final de la electroforesis como se explica en el Cuadro 7.

6. El gel después de 20 a 30 min gelificó y se colocó la bandeja que lo contení en la cámara de electroforesis, se agregó un poco de TAE 1X sobre el gel, se retiró el peine con cuidado para no romper las paredes de los pocillos en el gel.

7. Se adicionó TAE 1X en la cámara electroforética hasta que el gel quedó sumergido 1 a 2 mm.

8. Cada muestra de ADN que se cargó en el gel, se mezcló previamente con 0.2 volumenes de buffer de carga 6X. Usualmente, se cargaron en el gel 2 µl (100 ng/µl) de marcador de pesos moleculares (1kb DNA Ladder, Promega) y 5 µl de los productos de ADN amplificados por PCR.

9. En el caso de reacciones de PCR cuyos productos de ADN amplificados se enviaron a secuenciar, se cargó el volumen total de la reacción de PCR.

10. Se colocó la tapa de la cámara electroforética. Se conectaron los cables de la tapa a la fuente de poder, de acuerdo a su polaridad y color de cable.

11. La fuente de poder se encendió, se establecieron las condiciones de la electroforesis a 50 volts por 60 a 120 min, dependiendo de la cámara y del porcentaje de agarosa utilizados (Cuadro 7).

12. Cuando la electroforesis terminó, la bandeja con el gel se transfirió a un Transiluminador con luz UV (302 nm), se encendió el Transiluminador y se tomaron fotografías con una cámara digital (Kodak EDAS 290) con tiempos de exposición de 0.5 a 1.5 seg. Las fotografías se etiquetan con un código que representa el número de la libreta y el número de la página donde se colocará la fotografía del gel.

Cuadro 6. Reactivos usados para preparar Buffer TAE 50X (Tris Acétato-EDTA) pH 8.5.

Reactivo	**Concentración**	**Cantidad para 250 ml**	**Cantidad para 1 L**
Trizma Base	40 mM	60.5 g	242 g
Ác. Acético	20 mM	14.25 ml	57.1 ml
EDTA-Na_2	1 mM	9.3 g	37.2 g
Ajustar pH a 8.5 con Ác. Acético, esterilizar en autoclave por 20 min.			

Cuadro 7. Características de las cámaras de electroforesis y de los geles de agarosa que se utilizaron para analizar productos de PCR.

Cámara	Número de carriles	Cantidad de agarosa [1 %] (Tiempo)	Cantidad de agarosa [1.5 %] (Tiempo)	TAE 1X	Bromuro de etidio (10 mg/ml)
Mini	8	0.3 g (45 min)	0.45 g (60 min)	30 ml	1.5 µl
Chica	12	0.45 g (45 min)	0.675 g (60 min)	45 ml	2.5 µl
Mediana	15/20	0.75 g (60 min)	1.125 g (90 min)	75 ml	3.75 µl
Grande	35/40	1.5 g (90 min)	2.25 g (120 min)	150 ml	*

*Después de la electroforesis, los geles se cortan con ayuda de una espátula para separar el gel superior del inferior, cada gel se sumerge de forma independiente en una solución de bromuro de etidio/Agua destilada (1 µl/1 ml) por 15 min.

Cuadro 8. Preparación del buffer de carga 6X (GLB, Gel Loading Buffer 6X)

Reactivo	**Concentración**	**Cantidad para 1 ml**	**Cantidad para 20 ml**
Glicerol	50 %	500 µl	10 ml
EDTA pH 8.0	1 mM	10 µl (0.1 M)	200 µl (0.1 M)
Azul de bromofenol	0.25 %	25 µl	500 µl
Xylen cianol	0.25 %	25 µl	500 µl
H_2O	-	440 µl	8.8 ml

Purificación de los productos de ADN amplificados por PCR (Fig. 3)

1. Se utilizó un kit comercial de la marca Promega, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.
2. Hacer electroforesis de los productos de PCR. **Paso 1.**
3. Cortar las rebanadas del gel que contengan el fragmento de ADN con bisturí en luz UV (usar bata, guantes y mascara de acrílico). **Paso 2.**

1. Microtubos de 1.5 ml vacíos se pesaron en la balanza, colocar la rebanada del gel, y pesar nuevamente el microtubo. **Paso 2.**

2. Añadir un volumen de solución de unión a la membrana.

3. Incubar a 55 °C por 10 min o hasta que se disuelva el gel, agitar ocasionalmente. **Paso 3.**

4. Marcar tubos de colecta y colocar columnas de purificación (ambos vienen con el kit), transferir un máximo de 800 µl a la columna. Incubar 1 min. **Paso 4.**

5. Centrifugar a 13,200 rpm por 1 min, descartar la elución y regresar la columna al tubo colector. **Paso 4.**

6. Adicionar 700 µl de solución de lavado de membrana, centrifugar a 13,200 rpm por 1 min y descartar fluido. **Paso 4.**

7. Repetir el paso de lavado con 500 µl de solución de lavado de membrana. **Paso 4.**

8. Centrifugar la columna vacía por 1 min a 13,200 rpm. **Paso 4.**

9. Transferir la columna a un microtubo estéril de 1.5 ml. **Paso 4.**

10. Adicionar de 30 a 50 µl de agua grado biología molecular. Incubar por 1 min. **Paso 4.**

11. Centrifugar a 13,200 rpm por 1 min, descartar la columna y almacenar la muestra a 4 °C. **Paso 4.**

12. Mandar secuenciar el producto de PCR purificado a Mocrogen Korea.

Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega.

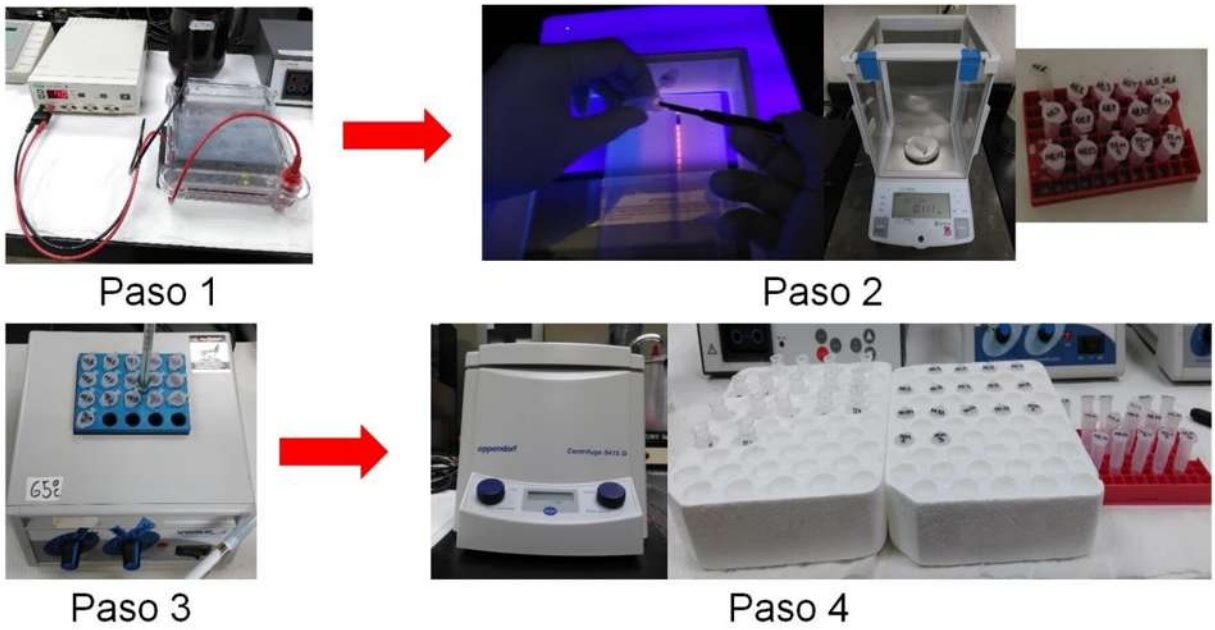


Figura 3. Pasos para la purificación de los productos de ADN amplificados por PCR.